

# **Aspectos estructurales y funcionales de las comunidades microbianas del suelo en una cronosecuencia de uso agrícola del pedemonte de Yungas**

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Micaela Tosi**

Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2008

Lugar de trabajo: Cátedra de Microbiología Agrícola e INBA, Facultad de Agronomía, UBA



**FAUBA**

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires





## COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

**Olga Susana Correa**

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

*Magister Scientiae* (Universidad de Buenos Aires)

Co-directora

**Marcela Susana Montecchia**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora, área Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de estudios

**Hugo Daniel Chludil**

Farmacéutico (Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco")

Doctor en Farmacia (Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco")

## JURADO DE TESIS

**Adriana Abril**

Bióloga (Universidad Nacional de Córdoba)

Doctora, área Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba)

**Adriana Fabra**

Licenciada en Microbiología (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctora, área Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

**Elena del Valle Gómez**

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Rosario)

Doctora, área Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)



*A mis viejos, que desde siempre.*



Son muchos y son todos ellos. No voy a pecar por omisión.  
Son familia, son amigos, compañeros. Son maestros y colegas.  
Algunos un poco de todo.  
Son los de siempre o pasajeros, del pasado y el presente.

Gracias por el cariño, la enseñanza y la paciencia.  
Gracias por el apoyo y más aún por el aguante (a mi entender cosas bien distintas).



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

Micaela Tosi



## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS**

### **Artículos en revistas internacionales con referato**

Tosi, M., O.S. Correa, M.A. Soria, J.A. Vogrig, O. Sydorenko, y M.S. Montecchia. 2016. Land-use change affects the functionality of soil microbial communities: a chronosequence approach in the Argentinian Yungas. *Applied Soil Ecology* 108: 118-127

### **Capítulos de libro**

Correa, O.S., V.M. Chiochio, M.S. Montecchia, M. Tosi, A. Fernández Di Pardo, E. Simonetti, F. Spagnoletti, O. Sydorenko, y J.A. Vogrig. 2013. Microorganismos nativos para una gestión sustentable de los ecosistemas terrestres. pp.: 195-214. En: Albanesi, A. (ed.), *Microbiología Agrícola: un aporte de la Investigación en Argentina*. Ediciones Magna, Tucumán, Argentina. ISBN: 978-987-1726-17-2

Tosi, M., M.S. Montecchia, D.G. Ortiz, O. Sydorenko, M.A. Soria, y O.S. Correa. 2013. Estabilización de la eficiencia metabólica microbiana en suelos sojeros del NOA. pp. 179-187. En: Díaz-Zorita, M., Correa, O., Fernández Canigia, M., Lavado, R. (eds.), *Aportes de la microbiología a la producción de cultivos*. EFA, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-987-29338-2-1



## ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1 - Antecedentes y presentación del problema	3
2 - Justificación	9
3 - Objetivos	10
4 - Hipótesis y predicciones	10
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>BIOMASA Y FUNCIONALIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO EN UNA CRONOSECUENCIA AGRÍCOLA DEL NOA</b>	<b>13</b>
<b>1 - Introducción</b>	<b>15</b>
1.1 - Antecedentes y presentación del problema	15
1.2 - Justificación	16
1.3 - Objetivos	16
1.4 - Hipótesis y predicciones	17
<b>2 - Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
2.1 - Descripción del área bajo estudio	17
2.2 - Muestreo y almacenamiento	18
2.3 - Propiedades físico-químicas del suelo	20
2.4 - Variables microbianas	22
2.4.1 - Biomasa microbiana	22
2.4.2 - Funcionalidad microbiana	22
2.4.2.1 - Respiración basal	22
2.4.2.2 - Actividad inducida por sustrato	23
2.4.2.3 - Actividad hidrolítica	24
2.4.2.4 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial	26
2.5 - Análisis de los datos	27
2.5.1 - Cálculo de cocientes e índices	27
2.5.2 - Análisis estadístico	27
<b>3 - Resultados</b>	<b>28</b>
3.1 - Propiedades físico-químicas del suelo: muestreos 2011 y 2013	28
3.2 - Variables microbiológicas: muestreo del año 2011	31
3.2.1 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica	31
3.2.2 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial	34
3.3 - Variables microbiológicas: muestreo del año 2013	35
3.3.1 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica	35
3.3.2 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial	38
3.4 - Relación entre variables microbiológicas y variables físico-químicas del suelo	40
3.5 - Análisis de integración entre resultados de ambos muestreos	42
<b>4 - Discusión</b>	<b>43</b>
4.1 - Propiedades físico-químicas del suelo	43
4.2 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica	44
4.3 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial	50
4.4 - Aportes y discrepancias del muestreo de 2013	51
4.5 - Síntesis de los resultados obtenidos	53
<b>5 - Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA VIABLE A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN SUELOS DE UNA CRONOSECUENCIA AGRÍCOLA DEL NOA</b>	<b>55</b>
<b>1 - Introducción</b>	<b>57</b>
1.1 - Antecedentes y presentación del problema	57
1.2 - Justificación	58

1.3 - Objetivos	58
1.4 - Hipótesis y predicciones	58
<b>2 - Materiales y métodos</b>	<b>59</b>
2.1 - Descripción del área bajo estudio	59
2.2 - Muestreo y almacenamiento	59
2.3 - Obtención y cuantificación de PLFA	59
2.3.1 - Extracción y fraccionamiento de lípidos, y metilación de los ácidos grasos	59
2.3.2 - Determinación, identificación y cuantificación	60
2.4 - Nomenclatura de ácidos grasos	61
2.5 - Análisis de los datos	61
<b>3 - Resultados</b>	<b>62</b>
3.1 - Detección e identificación	62
3.2 - Biomasa microbiana viable y marcadores taxonómicos	64
3.3 - Indicadores de <i>status</i> metabólico	65
3.4 - Perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos	65
3.5 - Relación con variables funcionales y propiedades físico-químicas del suelo	68
<b>4 - Discusión</b>	<b>69</b>
<b>5 - Conclusiones</b>	<b>73</b>

#### **CAPÍTULO 4**

#### **ABUNDANCIA DE BACTERIAS METANÓTROFAS EN SUELOS DE UNA CRONOSECUENCIA DE USO AGRÍCOLA DEL NOA**

<b>1 - Introducción</b>	<b>77</b>
1.1 - Antecedentes y presentación del problema	77
1.2 - Justificación	79
1.3 - Objetivos	79
1.4 - Hipótesis y predicciones	79
<b>2 - Materiales y métodos</b>	<b>80</b>
2.1 - Descripción del área bajo estudio	80
2.2 - Muestreo y almacenamiento	80
2.3 - Preparación y análisis de las muestras	80
2.3.1 - Extracción de ADN y cuantificación	80
2.3.2 - Optimización de condiciones de PCR	80
2.3.3 - Preparación de estándares para los ensayos de qPCR	82
2.3.4 - Optimización de los ensayos de qPCR	82
2.3.5 - Cuantificación en qPCR	82
2.4 - Análisis estadístico	83
<b>3 - Resultados</b>	<b>84</b>
3.1 - Abundancia de bacterias metanótrofas	84
3.2 - Bacterias metanótrofas de tipo I y de tipo II	84
3.3 - Correlación con otras variables medidas	86
<b>4 - Discusión</b>	<b>86</b>
<b>5 - Conclusiones</b>	<b>90</b>

#### **CAPÍTULO 5**

#### **ESTABILIDAD (RESISTENCIA Y RESILIENCIA) DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO ANTE UN EVENTO DE ESTRÉS HÍDRICO**

<b>1 - Introducción</b>	<b>93</b>
1.1 - Antecedentes y presentación del problema	93
1.2 - Justificación	94
1.3 - Objetivos	94
1.4 - Hipótesis y predicciones	94
<b>2 - Materiales y métodos</b>	<b>95</b>
2.1 - Descripción del área bajo estudio y muestreo	95
2.2 - Muestras de suelo utilizadas	95

2.3 - Diseño experimental	95
2.4 - Determinaciones realizadas	97
2.4.1 - Variables estructurales	97
2.4.1.1 - Biomasa microbiana molecular	97
2.4.1.2 - Ácidos grasos de los fosfolípidos	98
2.4.2 - Variables funcionales	98
2.4.2.1 - Respiración basal	98
2.4.2.2 - Respiración inducida por sustrato	98
2.5 - Análisis de los datos	99
2.5.1 - Exposición de los resultados	99
2.5.2 - Análisis estadístico	99
<b>3 - Resultados</b>	<b>100</b>
<b>4 - Discusión</b>	<b>110</b>
<b>5 - Conclusiones</b>	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO 6</b>	
CONCLUSIONES GENERALES	119
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>139</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 2	pág.
<b>Cuadro 1.</b> Descripción de los sitios muestreados	21
<b>Cuadro 2.</b> Sustratos presentes en las microplacas utilizadas en 2013, clasificados según su estructura química	27
<b>Cuadro 3.</b> Propiedades físico-químicas de los suelos de la cronosecuencia agrícola en el muestreo del año 2011	28
<b>Cuadro 4.</b> Propiedades físico-químicas de los suelos de la cronosecuencia agrícola en el muestreo del año 2013	29
<b>Cuadro 5.</b> Cocientes de propiedades microbiológicas y físico-químicas medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola del muestreo 2011 (0, 3-5, 11-14 y 28-30 años de uso agrícola)	33
<b>Cuadro 6.</b> Cocientes de propiedades microbiológicas y físico-químicas medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola del muestreo 2013 (0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola)	37
<b>Cuadro 7.</b> Índices de diversidad de utilización de sustratos carbonados obtenidos a través de la siembra en microplacas de suelos del muestreo 2013	40
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Cuadro 8.</b> Ácidos grasos de los fosfolípidos detectados en las muestras de suelo analizadas	63
<b>Cuadro 9.</b> Marcadores taxonómicos calculados con datos de PLFA para suelos con 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola.	67
<b>Cuadro 10.</b> Indicadores de <i>status</i> metabólico calculados con datos de PLFA para suelos con 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola	67
<b>Cuadro 11.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre los marcadores taxonómicos o fisiológicos de PLFA y las variables microbiológicas medidas en el Capítulo 2	68
<b>Cuadro 12.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre diferentes estructuras de PLFA y variables físico-químicas del suelo	69
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Cuadro 13.</b> Grupos funcionales estudiados por ensayos de qPCR, con sus genes específicos y primers utilizados para su amplificación	81
<b>Cuadro 14.</b> Perfil térmico, concentración de primers y concentración de ADN utilizados en la amplificación de cada gen por qPCR	81
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>Cuadro 15.</b> Valores de las variables medidas en la instancia inicial del ensayo de estrés para suelos de 2011 y 2013 pertenecientes a ambientes de monte y agrícolas de corta y larga historia	101
<b>Cuadro 16.</b> Biomasa viable (BMv) y abundancia de hongos obtenidas a partir de la técnica PLFA para el suelo de monte y los suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) en las condiciones iniciales y en los tiempos de resistencia (rt), resiliencia a corto plazo (rl-cp) y resiliencia a largo plazo (rl-lp)	108

**MATERIAL SUPLEMENTARIO**

---

<b>Cuadro S1.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre variables microbiológicas y físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola, muestreo 2011	131
<b>Cuadro S2.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre variables microbiológicas y físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola, muestreo 2013	131
<b>Cuadro S3.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia de genes de interés y las propiedades físico-químicas incluyendo ambos muestreos (2011 y 2013)	132
<b>Cuadro S4.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia de genes de interés y las variables físico-químicas para suelos agrícolas de ambos muestreos (2011 y 2013)	132
<b>Cuadro S5.</b> Porcentaje de variación del tratamiento de estrés hídrico con respecto al control en las variables medidas en ambos muestreos (años 2011 y 2013) para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente)	133

## ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	pág.
<b>Figura 1.</b> Evolución de la superficie sembrada con soja en el departamento de Anta, provincia de Salta, desde la campaña 1970/71 hasta la actualidad	4
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 2.</b> Esquema representando el diseño de muestreo utilizado en 2011 y 2013	19
<b>Figura 3.</b> Relación entre la hidrólisis de acetato de fluoresceína (HDAF) medida en 2013 y las actividades hidrolíticas medidas en 2011: amonificación y actividad fosfatasa (AF) ácida y alcalina	25
<b>Figura 4.</b> Variables microbianas en suelos de la cronosecuencia agrícola del muestreo 2011: 0, 3-5, 11-14 y 28-30 años bajo uso agrícola. A) CBM: carbono de la biomasa microbiana, B) RB: respiración basal, C) amonificación, D y E) actividad fosfatasa (AF) ácida y alcalina, respectivamente	32
<b>Figura 5.</b> Cocientes de actividad por unidad de biomasa microbiana en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2011: 0, 3-5, 11-14 y 28-30 años bajo uso agrícola. A) cociente metabólico o $qCO_2$ , y B) AWCD ( <i>average well colour development</i> ) por unidad de CBM	33
<b>Figura 6.</b> Evolución del <i>average well colour development</i> (AWCD) bruto (A) y por unidad de carbono de la biomasa microbiana o CBM (B) durante la incubación de suelos del muestreo 2011 en microplacas con distintos sustratos carbonados	34
<b>Figura 7.</b> ACP de <i>Community Level Physiological Profiling</i> resumiendo el consumo de sustratos carbonados, agrupados por estructura química, en suelos de la cronosecuencia del muestreo 2011	35
<b>Figura 8.</b> Variables microbianas en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola. A) CBM: carbono de la biomasa microbiana, B) RB: respiración basal, y C) HDAF: hidrólisis de diacetato de fluoresceína	36
<b>Figura 9.</b> Cocientes de actividad por unidad de biomasa microbiana en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola. A) cociente metabólico o $qCO_2$ , y B) AWCD ( <i>average well colour development</i> ) por unidad de CBM	37
<b>Figura 10.</b> Variables microbianas en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola. A) SIR: respiración inducida por sustrato, B) SIR rta.: respuesta al agregado de sustrato, y C) ADH: actividad deshidrogenasa	38
<b>Figura 11.</b> Evolución del <i>average well colour development</i> (AWCD) bruto (A) y por unidad de carbono de la biomasa microbiana o CBM (B) durante la incubación de suelos del muestreo 2013 en microplacas con distintos sustratos carbonados	39
<b>Figura 12.</b> ACP de <i>Community Level Physiological Profiling</i> resumiendo el consumo de sustratos carbonados, agrupados por estructura química, en suelos de la cronosecuencia del muestreo 2011	39
<b>Figura 13.</b> ACP de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B) medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola, muestreo 2011	41
<b>Figura 14.</b> ACP de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B) medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola, muestreo 2013	41
<b>Figura 15.</b> Círculos de correlación del análisis multifactorial integrando variables microbiológicas (negro) y físico-químicas (gris) en cada cronosecuencia: 2011 (A) y 2013 (B)	42
<b>Figura 16.</b> Círculos de correlación del análisis multifactorial integrando ambas cronosecuencias (negro: 2011 y gris: 2013) en términos de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B)	43

---

**CAPÍTULO 3**


---

<b>Figura 17.</b> Abundancia relativa de los ácidos grasos de los fosfolípidos con mayor frecuencia en el total de las muestras	62
<b>Figura 18.</b> Dinámica de A) biomasa viable (BMv) o PLFA total, B) relación hongos:bacterias y, C) cociente entre el ácido graso cy19:0 y su precursor, en la cronosecuencia del muestreo 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola	64
<b>Figura 19.</b> Relación entre la biomasa viable (PLFA total) y el carbono de la biomasa microbiana (CBM) medido en el Capítulo 2	65
<b>Figura 20.</b> NMDS ( <i>non-metric multidimensional scaling</i> ) esquematizando la similitud entre perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos de las CMS en la cronosecuencia agrícola del muestreo 2013	66
<b>Figura 21.</b> Biplot del análisis discriminante indicando los ácidos grasos con mayor capacidad para discriminar entre ambientes de la cronosecuencia agrícola del muestreo 2013	66

---

**CAPÍTULO 4**


---

<b>Figura 22.</b> Abundancia del gel funcional <i>pmoA</i> (metanótrofos totales) en suelos de una cronosecuencia agrícola muestreados en 2011 (izq.) y 2013 (der.)	84
<b>Figura 23.</b> Abundancia de metanótrofos de tipo I ( <i>Gammaproteobacteria</i> ) en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados en 2011 (izq.) y 2013 (der.)	85
<b>Figura 24.</b> Abundancia de metanótrofos de tipo II ( <i>Alphaproteobacteria</i> ) en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados en 2011 (izq.) y 2013 (der.)	85
<b>Figura 25.</b> Relación entre metanótrofos de tipo II y tipo I en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados en 2011 (barras negras) y 2013 (barras grises)	86

---

**CAPÍTULO 5**


---

<b>Figura 26.</b> Esquema de los ensayos de estrés hídrico	96
<b>Figura 27.</b> Respiración microbiana acumulada (mg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> ) en un suelo agrícola (símbolos blancos) y un suelo prístino (símbolos negros)	99
<b>Figura 28.</b> Relación entre el carbono de la biomasa microbiana (CBM) medido en el Capítulo 2 y las determinaciones iniciales de biomasa microbiana molecular (BMm) del ensayo de estrés	101
<b>Figura 29.</b> Evolución de variables microbianas en el ensayo de estrés 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). A) BMm: biomasa microbiana molecular, B) RB: respiración basal, C) RE: respiración específica y D) SIR-glu: respiración inducida por glucosa	102
<b>Figura 30.</b> Evolución de variables microbianas en el ensayo de estrés 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). A) BMm: biomasa microbiana molecular, B) RB: respiración basal, C) RE: respiración específica y D) SIR-glu: respiración inducida por glucosa	103
<b>Figura 31.</b> Respiración específica (RE) en suelos del ensayo 2011 al tiempo de resistencia o rt, calculada con la biomasa microbiana molecular antes (0 h) y luego del re-humedecimiento (24/72 h)	105
<b>Figura 32.</b> Respiración inducida por glucosa (SIR-glu) acumulada en dos períodos de la incubación: 0-24 h (tonos oscuros) y 24-72 h (tonos claros)	106
<b>Figura 33.</b> Evolución de la respiración inducida por ácido vanílico (SIR-van) en el ensayo de estrés 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco)	107
<b>Figura 34.</b> NMDS de los perfiles de PLFA en A) los distintos tiempos de medición y B) los distintos ambientes evaluados	109

**MATERIAL SUPLEMENTARIO**

---

<b>Figura S1.</b> Precipitaciones (ppt.) anuales acumuladas, expresadas por campaña agrícola, en la localidad de Las Lajitas, Salta, para el período julio 1986 - junio 2013	134
<b>Figura S2.</b> Precipitaciones (ppt.) mensuales acumuladas para las campañas 2010/11 (negro) y 2012/13 (gris) en la localidad de Las Lajitas, Salta	134
<b>Figura S3.</b> Contenido hídrico gravimétrico a campo de las muestras de suelo tomadas en 2011	135
<b>Figura S4.</b> Biplot del análisis de componentes principales evaluando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, agrupados por estructura química, de suelos de una cronosecuencia agrícola	135
<b>Figura S5.</b> Evolución de la biomasa microbiana molecular (BMm) en los ensayos de 2011 y 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia sometidos a estrés hídrico y controles	136
<b>Figura S6.</b> NMDS ( <i>non-metric multidimensional scaling</i> ) de los perfiles de PLFA de la Figura 34 con superposición de las distintas estructuras químicas de ácidos grasos	137

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

**16S rDNA:** gen que codifica para el rRNA 16S

**A:** absorbancia

**ACP:** análisis de componentes principales

**AD:** análisis discriminante

**ADH:** actividad deshidrogenasa

**AF:** actividad fosfatasa

**agro-c:** ambiente de corta historia agrícola

**agro-l:** ambiente de larga historia agrícola

**AMF:** análisis multifactorial

**Anammox:** *anaerobic ammonium oxidation* (oxidación anaeróbica del amonio)

**ANOSIM:** *analysis of similarities* (análisis de similitudes)

**AWCD:** *average well colour development* (desarrollo promedio de color o consumo promedio de utilización de sustratos carbonados en microplacas)

**BLAST:** *basic local alignment search tool* (alineamiento de secuencias de tipo local)

**BMm:** biomasa microbiana molecular

**BMv:** biomasa microbiana viable (dato de ácidos grasos de los fosfolípidos)

**CBM:** carbono de la biomasa microbiana

**CC:** capacidad de campo

**CE:** conductividad eléctrica

**CHS:** contenido hídrico en saturación

**CLPP:** *community-level physiological profiling* (perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas)

**CMS:** comunidades microbianas del suelo

**CNP:** variable artificial sumatoria del contenido de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo extractable del suelo

**CO:** carbono orgánico

**CP:** componente principal (cada una de las variables construidas por el análisis de componentes principales)

**Ct:** *cycle threshold* (umbral de ciclos en qPCR)

**DGGE:** *denaturing gradient gel electrophoresis* (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante)

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNRA:** *dissimilatory nitrate reduction to ammonium* (reducción disimilatoria del nitrato a amonio)

**fl.:** fluoresceína

**GC-MS:** *gas chromatography-mass spectrometry* (cromatografía de gases y espectrometría de masas)

**GEI:** gases de efecto invernadero

**HDAF:** hidrólisis de diacetato de fluoresceína

**IS:** “Isandrea” (finca)

**LR:** “La Reina” (finca)

**MUB:** *modified universal buffer* (buffer universal modificado)

**NMDS:** *non-metric multidimensional scaling* (escalamiento multidimensional no métrico)

**OTU:** *operational taxonomic unit* (unidad taxonómica operativa)

**PC:** “Puesto Cristo” (finca)

**PCR:** *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

**PLFA:** *phospholipid fatty acids* (ácidos grasos de los fosfolípidos)

***pmoA*:** gen que codifica para la subunidad alfa de la enzima metano-monooxigenasa particulada, involucrada en la oxidación del metano

**pnf:** paranitrofenol o 4-nitrofenol

**qCO<sub>2</sub>:** cociente metabólico (RB CBM<sup>-1</sup>)

**qPCR:** PCR cuantitativa o en tiempo real

**RB:** respiración basal (sin agregado de sustrato)

**RE:** respiración específica (RB BMm<sup>-1</sup>)

**rl-cp:** resiliencia a corto plazo

**rl-lp:** resiliencia a largo plazo

**rt:** resistencia

**SIR:** *substrate-induced respiration* (respiración inducida por sustrato)

**SIR-glu:** respiración inducida por glucosa

**SIR-rta.:** respuesta al agregado de glucosa (SIR:RB)

**SIR-van:** respiración inducida por ácido vanílico

**TBE:** buffer Tris/borato/EDTA

**TFF:** trifeníl-formazán

**Tr:** tiempo de retención (en GC-MS)

**T-RFLP:** *terminal restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal)

## RESUMEN

**Título:** Aspectos estructurales y funcionales de las comunidades microbianas del suelo en una cronosecuencia de uso agrícola del pedemonte de Yungas

Las Yungas del noroeste argentino han sido fuertemente afectadas por el desmonte de tierras prístinas, en particular de pedemonte, para el cultivo extensivo. El objetivo de esta tesis fue estudiar, a través de una cronosecuencia, el efecto del desmonte y el tiempo bajo uso agrícola sobre las comunidades microbianas del suelo (CMS) en una zona productiva de la región. El muestreo se realizó sobre tres fincas como réplicas independientes de cada categoría de uso: 0, 3-5, 11-14 y 28-30 años de cultivo. Se evaluaron aspectos estructurales y funcionales de las CMS, así como su resistencia y resiliencia al estrés hídrico. Luego de 3-5 años de cultivo se destacó una reducción en biomasa microbiana y funciones hidrolíticas (fosfatasa ácida y amonificación), y un incremento en respiración basal y cociente metabólico  $qCO_2$  (*i.e.*, menor eficiencia metabólica). Asimismo, con PCR cuantitativo se detectó una reducción en la abundancia de metanótrofos totales y de tipo II. La mayoría de las variables se estabilizaron (biomasa, actividad hidrolítica) o restablecieron parcialmente (respiración,  $qCO_2$ ) a lo largo de la cronosecuencia. En respuesta al estrés hídrico impuesto, las CMS de larga historia agrícola presentaron la mayor resistencia y resiliencia en biomasa, estructura de ácidos grasos de los fosfolípidos y eficiencia metabólica. Por su parte, las CMS de monte destacaron por su resiliencia en estos aspectos y mayor resistencia en la utilización de un sustrato recalcitrante, mientras que las de corta historia agrícola se mostraron en general más frágiles y variables. Los resultados sugieren que las CMS se alteran marcadamente con posterioridad al desmonte, en respuesta a cambios en la cobertura vegetal y a las labores ligadas a esta transición, en tanto que sucesivos años bajo el mismo manejo agrícola parecen inducir una homogeneización de las CMS junto con una adaptación a las condiciones impuestas por la agricultura.

**Palabras clave:** desmonte, NOA, biomasa microbiana, actividad microbiana, estabilidad, estrés hídrico, metanotrofia



## ABSTRACT

**Title:** Structure and functionality of soil microbial communities in an agricultural chronosequence from the Yungas pedemontane forest

The Yungas from NW Argentina have been extensively affected by deforestation of pristine lands, mainly piedmont, for cropping. The aim of this thesis was to study, using a chronosequence approach, the effect of deforestation and time under cultivation on soil microbial communities (SMC) in a productive area of the region. Sampling was carried out in three farms as independent replicates for each land use stage: 0, 3-5, 11-14 and 28-30 years under cultivation. The structure and functionality of SMC was studied, along with their resistance and resilience to drought stress. After 3-5 years of cropping, the main changes were a reduction in microbial biomass and hydrolitic activities (acid phosphatase and ammonification) and an increase in basal respiration and microbial quotient or  $qCO_2$  (*i.e.*, lower metabolic efficiency). Moreover, qPCR detected a reduction of total and type II methanotrophs in response to land-use change. Most variables were either stabilized (biomass, hydrolitic activity) or partially recovered (respiration,  $qCO_2$ ) along the chronosequence. In response to experimental drought, SMC from a long term agricultural soil were the most resistant and resilient in terms of biomass, phospholipid fatty acid structure and metabolic efficiency. The pristine soil exhibited high resilience in those aspects, together with high resistance in the utilization of a recalcitrant compound, while the short-term agricultural soil appeared to be more fragile in general terms. Together, these results suggest that SMC are mostly affected by deforestation and land-use change, in response to drastic changes in vegetation and disturbance cause by deforestation and agricultural practices. Increasing time under cultivation seems to drive a homogenization and adaptation of SMC to the edaphic environment induced by agriculture.

**Keywords:** deforestation, NW Argentina, microbial biomass, microbial activity, stability, drought stress, methane oxidation



**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**







## 1 - Antecedentes y presentación del problema

### Cambio en el uso de la tierra en la ecorregión de Yungas

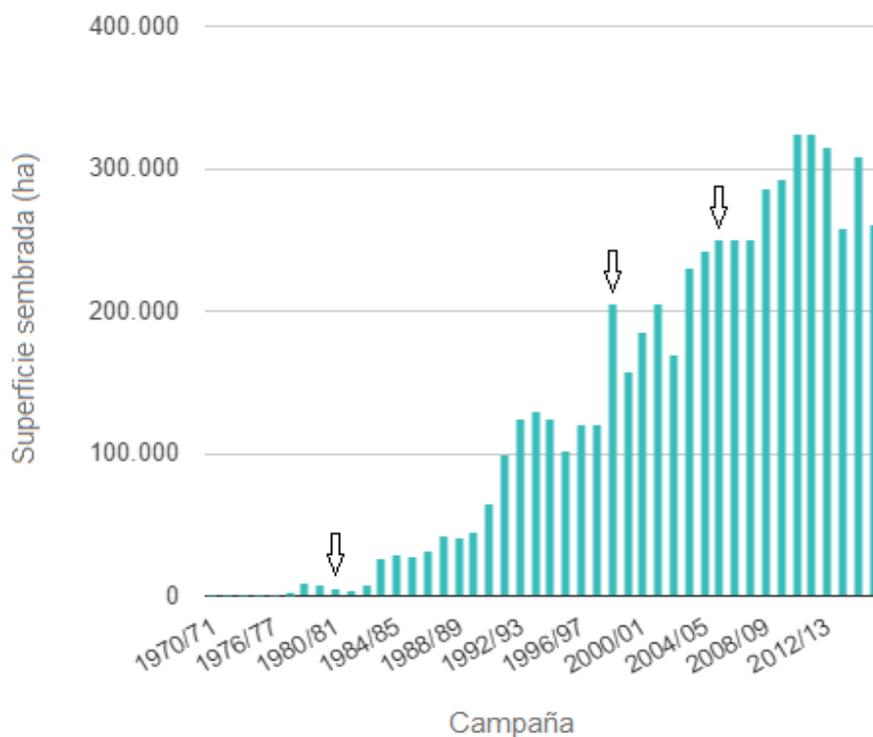
En las últimas décadas, las regiones tropicales y subtropicales han evidenciado un crecimiento en la superficie de tierras dedicadas a la agricultura o ganadería a expensas de la deforestación de zonas prístinas. Este es un fenómeno particularmente relevante en América del Sur, África y Asia (Achard *et al.*, 2014; FAO, 2012), donde el principal motor del desmonte lo constituye la implementación de sistemas agrícolas modernos, basados en cultivos de grano extensivos (Grau *et al.*, 2005). En Argentina, los casos más representativos se localizan en las ecorregiones de Yungas, Chaco y Selva Paranaense, donde grandes superficies de bosque nativo fueron y siguen siendo desmontadas (Gasparri *et al.*, 2008; Gasparri y Grau, 2009; Viglizzo *et al.*, 2011; Volante y Paruelo, 2015). Según Brown *et al.* (2006), en Argentina se han llegado a deforestar unas 250.000 ha anuales, principalmente en las mencionadas ecorregiones.

Las Yungas, conocidas también bajo el nombre de “selva tucumano-boliviana” o “selva tucumano-oranense”, son selvas subtropicales de montaña que se extienden desde el norte de la provincia de Catamarca hasta el sur de Bolivia (Brown *et al.*, 2002; Malizia *et al.*, 2012). Esta ecorregión constituye uno de los *hotspots* de biodiversidad más importantes del mundo (Myers *et al.*, 2000). Tal es su relevancia en este sentido que, en Argentina, las Yungas y la Selva Paranaense abarcan más del 50% de la biodiversidad en menos del 2% de la superficie (Brown *et al.*, 2002). Ello explica el gran interés depositado en el estudio de la pérdida de diversidad animal y vegetal sujeta al desmonte, y en la creación de diversas áreas protegidas (Brown *et al.*, 2002; Brown y Malizia, 2004). Además de ser un reservorio de biodiversidad, la selva provee numerosos servicios ecosistémicos como la regulación hídrica (selva de altura), el secuestro de carbono y la mitigación de gases de efecto invernadero (GEI).

De la superficie total de Yungas argentinas (~ 5 millones de hectáreas), la mitad corresponde a Yungas en sentido estricto y la otra mitad a Yungas en transición, situadas en los ecotonos con Chaco y Chaco Serrano, y por ende caracterizadas por ser zonas más secas, más simples y menos diversas (Brown *et al.*, 2002). La franja altitudinal más baja de las Yungas (400-700 m snm) es denominada selva pedemontana, aunque también se la conoce como selva de transición, debido a que constituye un gradiente húmedo-seco con el Bosque Chaqueño Semiárido hacia el este (Brown y Malizia, 2004). Es este sector de pedemonte y transición el más afectado por el avance de la frontera agrícola, principalmente para el cultivo de caña, cítricos y, durante las últimas décadas, soja y otros cultivos de grano (Brown y Malizia, 2004; Gasparri *et al.*, 2008). Esto se debe a que son tierras con una mayor aptitud agrícola que las selvas de altura, debido a su menor pendiente y a la suficiente dotación de agua (Paruelo *et al.*, 2005). Sumado a esto, su nivel de protección ambiental es comparativamente menor que el de las selvas de altura (Brown y Malizia, 2004).

El avance de la frontera agrícola en el noroeste argentino tuvo sus inicios a fines del siglo XIX y avanzó rápidamente, a un ritmo tal que para la década del '70 ya se había deforestado un 18% de la superficie de las Yungas subtropicales, y para el año 2010 esa cifra había aumentado al 31% (Malizia *et al.*, 2012). Uno de los cultivos pioneros fue la caña de azúcar, mientras que los cultivos anuales fueron impulsados recién alrededor de 1970, en respuesta a las oportunidades tecnológicas y a un aumento en las precipitaciones (Gasparri y Grau, 2009). Junto con una expansión de la agricultura en sentido oeste-este,

durante los '80 y los '90 se impulsó una tendencia al monocultivo de soja en respuesta a la demanda global de este cultivo, y, ya en los '90, la aparición de la soja transgénica mantuvo este crecimiento al compensar la reducción del precio de este cultivo (Gasparri y Grau, 2009). La expansión del cultivo de soja se sostuvo luego de la crisis de 2001 debido a los precios favorables a nivel internacional, la devaluación del peso y, a nivel local, la incertidumbre con respecto a la conservación de la selva nativa (Gasparri y Grau, 2009). Esta tendencia se ve reflejada claramente en la evolución de la superficie sembrada con soja, que se presenta en la Figura 1 para el caso del departamento de Anta, provincia de Salta, donde se ubica el sitio de estudio de esta tesis (MAGyP, 2016). En este departamento se deforestaron 615.582 ha en un período de 35 años, entre 1972 y 2007, lo cual equivale a un promedio de  $\sim 17.500 \text{ ha año}^{-1}$  (Gasparri y Grau, 2009).



**Figura 1.** Evolución de la superficie sembrada con soja en el departamento de Anta, provincia de Salta, desde la campaña 1970/71 hasta la actualidad. *Las flechas señalan el momento de desmonte de los sitios analizados en esta tesis.* Modificado de MAGyP (2016).

### Impacto del cambio en el uso de la tierra sobre el suelo

Cuando las tierras prístinas son desmontadas y reemplazadas por cultivos, y en especial cuando el manejo es predominantemente de monocultivo, los cambios cuali- y cuantitativos en la cobertura vegetal exponen al suelo a cambios drásticos, principalmente en términos de temperatura, balance hídrico, y dinámica del carbono y los nutrientes (Murty *et al.*, 2002; Gasparri *et al.*, 2008; Don *et al.*, 2011; Volante *et al.*, 2012). Sumado a esto, las tareas de desmonte e implementación de la agricultura imprimen modificaciones en aspectos físicos, químicos y biológicos del suelo. Al modificarse uno o más de estos aspectos se alteran los ciclos biogeoquímicos y se comprometen funciones clave del suelo, que actúa como filtro ambiental y como regulador del crecimiento vegetal, del agua y los nutrientes. Así, pueden producirse tanto mermas en la fertilidad física y

química de esos suelos, con repercusión sobre la productividad vegetal, como también consecuencias ambientales como una mayor emisión de GEI y/o una menor capacidad de secuestro de carbono (Gasparri *et al.*, 2008; Sy *et al.*, 2015).

Entre las potenciales consecuencias del desmonte y la actividad agrícola, una de las más estudiadas es la pérdida de materia orgánica (MO) del suelo (Murty *et al.*, 2002). En su revisión, estos autores concluyeron que el stock de carbono orgánico suele reducirse en los primeros años de cultivo (3-12 años), indicando que el mayor impacto sería consecuencia del desmonte y el cambio de uso de la tierra, a la vez que estas pérdidas serían de mayor magnitud en sistemas agrícolas que pastoriles. La agricultura estaría reduciendo la MO principalmente a través del frecuente disturbio físico y el menor aporte de material vegetal, con un efecto adicional impuesto por las tareas previas del desmonte (*e.g.*, quema del material vegetal) y por la pendiente de la región, que podría conducir a procesos erosivos. En Yungas y Chaco, Volante *et al.* (2012) encontraron que el desmonte para el cultivo no modificó sustancialmente la productividad primaria neta aérea, aunque sí llevó a una estacionalidad de la cobertura vegetal y, por ende, del *input* de carbono, con posibles consecuencias sobre la regulación del flujo hídrico y el control de procesos erosivos.

En los alrededores de la localidad de Las Lajitas, provincia de Salta, se han registrado severos problemas de densificación del suelo que afectan la aireación y el movimiento del agua (Rodolfo Gil, INTA Castelar, comunicación personal). Problemas físicos como éste ponen en riesgo el rendimiento, altamente dependiente de la oferta hídrica, pero también alteran el funcionamiento del suelo al dificultar la aireación y la distribución del agua en el perfil. En estas condiciones podría perjudicarse la actividad microbiana aeróbica y favorecerse la ocurrencia de procesos anaeróbicos, algunos de los cuales derivan en la pérdida de nutrientes del sistema y la emisión de GEI (*e.g.*: metanogénesis, desnitrificación). El proceso de densificación detectado por el grupo de trabajo a cargo de Rodolfo Gil fue más agudo en los primeros años de agricultura, coincidiendo con el reporte de Murty *et al.* (2002).

La concientización sobre los posibles cambios en el funcionamiento del suelo, con consecuencias en el ciclo del agua, el carbono y los nutrientes, surgió con posterioridad a la problemática de la biodiversidad, pero ya se debate sobre la pérdida de servicios ecosistémicos en Yungas y Chaco (Volante *et al.*, 2012). Las potenciales repercusiones del cambio en el uso de la tierra sobre los servicios ecosistémicos provistos por los bosques nativos, sumadas a la pérdida de biodiversidad que conlleva el desmonte, representan perjuicios que podrían contrarrestar significativamente los beneficios económicos de la actividad agrícola (Gasparri y Menéndez, 2004).

### **El suelo y sus comunidades microbianas**

Las actividades antrópicas mencionadas anteriormente son llevadas a cabo con escasa o nula conciencia sobre la importancia del suelo, que no sólo presta servicios ecosistémicos fundamentales, sino que constituye un recurso no renovable a escala de tiempo humano (Doran y Parkin, 1994). Gran parte de las funciones del suelo son llevadas a cabo, o influenciadas por, la actividad de los microorganismos que lo habitan. Tal como en otros hábitats, los microorganismos tienen un rol primordial en los ciclos biogeoquímicos, la degradación de la MO, la detoxificación de xenobióticos y la promoción del crecimiento vegetal, entre otros procesos (Doran y Zeiss, 2000). Como consecuencia de su rol clave en el funcionamiento del suelo, cualquier disturbio sobre las comunidades microbianas del suelo (CMS) afectará eventualmente los procesos del ecosistema edáfico (Brussaard,

2012), derivando, como ya se mencionó, en perjuicios ambientales tales como la contaminación de la napa freática, la emisión de GEI y la pérdida de nutrientes del sistema, con esperables consecuencias sobre la flora y la fauna (Herman y Maier, 2009). Sumado al aspecto funcional, los microorganismos del suelo tienen una gran importancia como reservorio genético, con una enorme diversidad que alberga un gran potencial biotecnológico (Bodelier, 2011).

Además de interactuar con otros organismos presentes en el ecosistema suelo (flora, microfauna y mesofauna), los microorganismos están estrechamente vinculados a sus fases mineral y orgánica, transformándolas y siendo a su vez influenciados por éstas. En una escala de microhábitat, la actividad microbiana es capaz de alterar su entorno y éste, a su vez, puede regular su actividad (Pietramellara *et al.*, 2002). Así, cualquier alteración del ambiente edáfico (*e.g.*: humedad, temperatura, concentración de iones, *input* de MO y nutrientes) repercute sobre su microbiota y, por ende, sobre diversas funciones llevadas a cabo en ese suelo. Tanto por esta sensibilidad a cambios en el ambiente como por su participación en las funciones primordiales del suelo, el estudio de los microorganismos se ha incrementado exponencialmente en los últimos años.

### **El estudio de las comunidades microbianas del suelo**

El actual reconocimiento de la importancia de los microorganismos en el estudio de los suelos responde principalmente al mayor conocimiento que se tiene sobre ellos, como consecuencia del surgimiento de nuevas herramientas para estudiarlos. Por muchos años los estudios de los microorganismos edáficos y su relación con la calidad han mostrado dos tendencias claras: por un lado, la determinación de un gran número de variables, muchas veces sin un interrogante claro y, de la mano de esto, la búsqueda de variables cada vez más precisas y descriptivas, en general mediante una mayor sofisticación en las técnicas utilizadas (metagenómica, proteómica, etc.).

Al día de hoy, el espectro de variables microbiológicas mensurables es amplio, y cada una de ellas describe, con mayor o menor especificidad y precisión, distintos aspectos de la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas (Paul, 2015). A pesar de los grandes avances metodológicos, las técnicas tradicionales siguen siendo ampliamente utilizadas, en buena parte debido a su relativa sencillez, rapidez y bajo costo, y a que muchas de ellas están estandarizadas a nivel internacional. Las metodologías clásicas o tradicionales reciben este nombre principalmente en comparación con las metodologías moleculares que han surgido en los últimos años. Las técnicas clásicas corresponden a (o derivan de) las primeras metodologías orientadas a describir las CMS de manera global y no a partir del cultivo de microorganismos. Esto último resultó ser una gran ventaja tanto por permitir estudiar las comunidades microbianas *in situ*, como por abarcar el ecosistema suelo, ya que no se limitan a la fracción cultivable, que hace ya varios años se sabe que corresponde tan sólo al 1-10% de la comunidad microbiana total (Voroney y Heck, 2015). Estas variables también suelen ser referidas como bioquímicas, dado que en general miden actividad enzimática específica o global. Según Trasar-Cepeda *et al.* (2008a), las variables más explicativas son aquellas que, como las técnicas tradicionales, caracterizan los ciclos biogeoquímicos y las transformaciones de la MO; es decir, aquellas que describen funcionalidad microbiana (*e.g.*, variables bioquímicas que reflejen la actividad microbiana global o de enzimas específicas).

Una de las preguntas más frecuentes en los últimos tiempos se refiere a la relación que existe entre la estructura y la función de las comunidades microbianas, es decir, hasta qué punto un cambio estructural en la comunidad, como la pérdida de diversidad microbiana

y de especies “raras”, puede determinar un cambio funcional (Bodelier, 2011). Las nuevas tecnologías de secuenciación han permitido un gran avance en el estudio de la diversidad microbiana del suelo, pero su real importancia para el funcionamiento del ecosistema edáfico continúa discutiéndose (Deng, 2012; Philippot *et al.*, 2013). La propia complejidad del sistema estudiado hace que las respuestas encontradas por distintos autores sean contradictorias (*e.g.*: Degens *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2001). Un factor que contribuye a esta gran variabilidad de respuestas es la redundancia funcional de las CMS, la cual implica que una misma función puede ser llevada a cabo por diversos grupos microbianos, derivando en que, ante una reducción en diversidad, esa función se siga llevando a cabo (Wertz *et al.*, 2007; Chaer *et al.*, 2009a). Según la bibliografía, esta respuesta sería esperable en el caso de funciones más generales (*e.g.*: descomposición de broza o respiración del suelo), en las que están involucrados diversos grupos microbianos (Griffiths *et al.*, 2000; Chaer *et al.*, 2009a). Por el contrario, funciones más específicas, a cargo de grupos más acotados (nitrificadores) y especializados (degradadores de xenobióticos), podrían ser más dependientes de la diversidad. A pesar del fundamento teórico de estas ideas, Philippot *et al.* (2013) no detectaron redundancia funcional en el heterogéneo y diverso grupo de los desnitrificadores, mientras que Noe y Abril (2013), en regiones semiáridas de Argentina, encontraron que la nitrificación se mostró inalterada ante cambios en la estructura genética de la comunidad nitrificadora (inducidos por pastoreo o factores naturales). La relación que existe entre la estructura y la función de las comunidades microbianas sigue sin ser lo suficientemente comprendida, y son necesarios estudios que vinculen estos aspectos enfocados en procesos de relevancia ambiental.

### **Comunidades microbianas del suelo en un contexto de cambio en el uso de la tierra**

En los últimos años ha crecido el interés por la ecología de los suelos y, en ese marco, el estudio de la respuesta de las CMS a diferentes tratamientos o disturbios. Existe, por ejemplo, un gran volumen de trabajos evaluando el impacto de distintas prácticas agrícolas (*e.g.*: Giuffré *et al.*, 2006; Monaco *et al.*, 2008; Kaschuk *et al.*, 2010), o distintos tipos de contaminación con xenobióticos o metales pesados (*e.g.*: Margesin y Schinner, 1989; Kumpiene *et al.*, 2013). Sin embargo, no son tan numerosos los estudios sobre el efecto del cambio en el uso de la tierra, comparando suelos prístinos con su contraparte convertida a la agricultura, quizás debido a que en muchos casos se carece de una situación prístina de referencia confiable. Hasta el momento, los trabajos publicados han reportado claros efectos del cambio en el uso de la tierra sobre la abundancia, diversidad y actividad de las CMS (*e.g.*, Bossio *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2006; Upchurch *et al.*, 2008; Montecchia *et al.*, 2011; Navarrete *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Brackin *et al.*, 2013).

Una particularidad de los estudios sobre el efecto del desmonte es que son de tipo observacional, con lo cual el ambiente anterior al desmonte se estudia a partir de tierras prístinas remanentes que permiten inferir qué tipo de cambios acontecieron. Una complicación adicional es que muchas variables no pueden ser controladas. Los ambientes, entonces, deben ser escogidos cuidadosamente, de manera que el ambiente prístino sea aledaño a las tierras cultivadas, para evitar la influencia de otros factores como la genética de los suelos, pero a la vez esté lo suficientemente apartado como para evitar la influencia del sistema agrícola.

El gran caudal de trabajos en ecología microbiana de suelos estuvo motivado, en principio, por el hecho de que los microorganismos, dada su gran sensibilidad, constituyen un promisorio indicador de cambios tempranos en el suelo y, por ende, de su

calidad. La intención inicial fue estudiar a las comunidades microbianas como indicadores biológicos de la calidad de los suelos (Anderson, 2003). En este contexto se invirtió gran esfuerzo en establecer indicadores idóneos o un set mínimo de datos (*minimum data set*) que permitiera monitorear la calidad de diferentes suelos, algo que todavía no se ha logrado y que, considerando la gran complejidad del sistema bajo estudio, probablemente no pueda simplificarse a ese nivel.

Nuestro grupo de trabajo es uno de los pioneros en el estudio de la respuesta de las comunidades microbianas de suelos de las Yungas al desmonte para el uso agrícola (Montecchia *et al.*, 2011). Previamente se habían publicado estudios de relevamiento de microorganismos dentro de los ambientes prístinos, como ser hongos para aplicaciones biotecnológicas (Pajot *et al.*, 2007; Rovati *et al.*, 2010) u hongos micorrícicos arbusculares (Becerra *et al.*, 2007). Abril y Bucher (2008) también realizaron un relevamiento en tres franjas altitudinales de las Yungas, con foco en variables microbianas como respiración y biomasa, y, a través de técnicas de cultivo, algunos grupos funcionales relacionados al ciclado de carbono y nitrógeno. En la misma región, otro grupo estudió las CMS haciendo foco en su respuesta a las prácticas agrícolas y la incidencia de hongos fitopatógenos (Perez-Brandán *et al.*, 2012). Estos mismos autores, en un trabajo posterior, incorporaron el factor de tiempo bajo uso agrícola y la comparación con el ambiente no disturbado (Pérez-Brandán *et al.*, 2014).

Un estudio exploratorio, relacionado con este trabajo de tesis, detectó claras diferencias en el comportamiento de las CMS al comparar ambientes contrastantes en términos del uso de la tierra (selva montana, selva pedemontana y sitios con monocultivo de caña de azúcar o de soja con diferente antigüedad) de los departamentos de Ledesma (Jujuy) y Anta (Salta). A través de técnicas microbiológicas tradicionales pudieron encontrarse diferencias en las CMS de diferentes zonas, diferentes estratos de selva y diferentes usos agrícolas, así como un efecto del cambio en el uso de la tierra. CMS de ambientes prístinos, y en particular de selva montana, presentaron mayor biomasa y actividad que aquellos bajo cultivo (Tosi *et al.*, 2010). Los resultados de ese estudio concuerdan con los publicados por Montecchia *et al.* (2011), quienes detectaron cambios a nivel estructural y en la utilización de diferentes sustratos carbonados en los mismos suelos. Tanto en el estudio preliminar como en el trabajo de Montecchia *et al.* (2011), dentro de cada zona productiva se encontraron muchas similitudes entre ambientes agrícolas, independientemente de la cantidad de años bajo cultivo, ya fueran 4, 40 o 100 años. Por otra parte, se hallaron diferencias entre distintos estratos de la selva de Yungas que contradicen los resultados de Abril y Bucher (2008). Estos resultados preliminares invitan a profundizar en el estudio de las CMS y su respuesta al fenómeno del desmonte para la agricultura, tal como se realizará en los sucesivos capítulos de esta tesis.

El volumen bibliográfico sobre microbiología de suelos, en particular los enfocados en su calidad, es indudablemente importante. Esta larga trayectoria, de la mano de avances metodológicos, ha aumentado notoriamente el conocimiento de las CMS tanto en términos de estructura como de función (Paul, 2015). Sin embargo, la complejidad del sistema sostiene tanto interrogantes como desafíos, que subyacen no sólo en el carácter heterogéneo del suelo, sino también en la diversidad, sensibilidad y distribución espacial de las comunidades microbianas que lo habitan. Predecir el comportamiento y su respuesta, así como el impacto que esto representa a nivel ecosistema, constituye un desafío, en especial en lo que concierne a la relación entre aspectos estructurales y funcionales (Bissett *et al.*, 2013).

## 2 - Justificación

La ecorregión de Yungas constituye un escenario comprometido, desde el punto de vista ambiental, por el avance de la frontera agrícola y el impacto de este fenómeno sobre esos suelos ha sido escasamente estudiado, a pesar de que se sabe que el suelo es altamente susceptible al desmonte y el cambio en el uso de la tierra. Por otro lado, los suelos proveen diversos servicios ecosistémicos y son las comunidades microbianas que lo habitan las responsables de llevar a cabo muchas de esas funciones. La respuesta de las CMS al cambio en el uso de la tierra no es aún clara y, sin embargo, es fundamental para comprender el verdadero impacto sobre el ecosistema.

Esta tesis contribuye al conocimiento de la dinámica de las CMS en un escenario de desmonte para la agricultura y en un esquema de cronosecuencia agrícola, de abordaje muy poco frecuente en la literatura. Además, la información obtenida aporta al conocimiento de las CMS nativas del pedemonte de Yungas, una ecorregión en la que este tipo de estudios es escaso. La mayor parte de esta tesis se enfoca en la funcionalidad de las comunidades microbianas utilizando herramientas que han sido ampliamente aceptadas para evaluar la calidad biológica de los suelos. La integración de los datos recolectados en esta tesis con otros obtenidos por el grupo de trabajo permite conectar aspectos estructurales y funcionales de la microbiota de esos suelos. Por otra parte, se informa sobre la abundancia de los microorganismos involucrados en el ciclo del metano, un gas de reconocido efecto invernadero cuya mitigación constituye uno de los servicios ecosistémicos prestados por el suelo, y su relación con el cambio en el uso de la tierra y el tiempo bajo agricultura. Finalmente, la evaluación de la potencial estabilidad de las comunidades microbianas a un evento de estrés se aborda mediante un enfoque dinámico, que trasciende el aspecto descriptivo.

El estudio observacional del Capítulo 2 está basado en variables microbiológicas tradicionales, elegidas por la disponibilidad de protocolos estandarizados y por la relativa practicidad y bajo costo de sus metodologías. Los protocolos estandarizados son fundamentales si se desea integrar datos a nivel global, además de que resultan particularmente interesantes para encarar un estudio en la ecorregión de Yungas, donde el análisis de los suelos y su microbiota es aún incipiente, pudiendo contribuir a una base de datos global sobre estas variables. Por otro lado, complementan los resultados del grupo de trabajo, que está perfeccionándose en técnicas más modernas, principalmente moleculares, que aportaron valiosa información para la discusión de los resultados de esta tesis. En los Capítulos 3, 4 y 5 se utilizan algunas metodologías más “sofisticadas”, cuyo abordaje fue necesario para encarar sus respectivos objetivos. El análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos del Capítulo 3 permitió inquirir en aspectos estructurales de las CMS, mientras que en el Capítulo 4, donde se propuso indagar específicamente sobre grupos funcionales asociados a la producción y oxidación de metano, se recurrió a técnicas moleculares como PCR cuantitativa. Por último, en el Capítulo 5, donde se estudió la respuesta al estrés hídrico trabajando con microcosmos, se cambió la metodología utilizada para estimar la biomasa microbiana por otra que resultara de alto rendimiento en la generación de datos (*high-throughput*), a fin de realizar en tiempo y forma las mediciones, y así evaluar con mayor precisión su respuesta al estrés.

### 3 - Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis fue contribuir al conocimiento de las comunidades microbianas del suelo en la ecorregión de Yungas, noroeste argentino, a través del estudio de aspectos estructurales y funcionales, y de su respuesta al cambio en el uso de la tierra (desmonte para uso agrícola) en la selva pedemontana.

Para ello, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

- Aplicando un esquema de muestreo en cronosecuencia, evaluar las modificaciones en la biomasa y funcionalidad de las CMS que surjan como resultado del desmonte y el tiempo bajo uso agrícola y, relacionar estos cambios con aspectos químicos y físicos de los suelos, obteniendo así una interpretación multifacética de los distintos escenarios estudiados.
- Profundizar en el estudio de la estructura de las CMS analizando la composición de la comunidad microbiana viable a través de un análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos.
- Indagar en la dinámica del grupo funcional de las bacterias metanótrofas, asociadas a la mitigación del metano atmosférico.
- Poner a prueba la estabilidad (resistencia y resiliencia) de las comunidades microbianas ante un evento de estrés hídrico severo.

### 4 - Hipótesis y predicciones

- El desmonte y la actividad agrícola imprimen un disturbio sobre el sistema suelo, el cual impacta en sus comunidades microbianas alterando su biomasa y funcionalidad. Las mayores alteraciones en las comunidades microbianas se observan con posterioridad al desmonte, ya que allí es cuando ocurren los cambios más drásticos. Luego de una larga historia de uso agrícola similar, las CMS se adaptan al nuevo ambiente edáfico y no son alteradas por subsecuentes años de prácticas agrícolas.

*Predicciones: En comparación con suelos prístinos, suelos bajo cultivo presentarían menor biomasa total, junto con una menor respiración, actividad hidrolítica y capacidad de utilización de distintos sustratos carbonados (diversidad funcional). Las variables medidas se estabilizarían en ciertos niveles luego de sucesivos años de cultivo bajo el mismo manejo, siendo similares entre suelos agrícolas de diferente antigüedad*

- Siguiendo lo planteado en la hipótesis anterior, la estructura (biomasa y composición) de la comunidad microbiana viable se ve fuertemente alterada con posterioridad al desmonte y la implementación de la actividad agrícola, pudiendo luego estabilizarse en respuesta a la adaptación al nuevo ambiente edáfico.

*Predicciones: La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, vista tanto como perfiles o como abundancia relativa de distintos marcadores taxonómicos o de status metabólico, diferiría marcadamente entre suelos prístinos y agrícolas, y, dentro de estos últimos, se asemejaría más entre suelos con mayor cantidad de años bajo cultivo. Suelos bajo cultivo presentarían valores similares de biomasa viable y menores a los de suelos prístinos.*

- Los distintos grupos funcionales que habitan el suelo ven alterada su abundancia en respuesta a los cambios en el ambiente edáfico que induce el desmonte para la agricultura. En este sentido, principalmente debido a la creciente densificación (y menor aireación) que induce el uso agrícola en suelos de la zona bajo estudio, se altera

la abundancia de bacterias metanotróficas u oxidadoras del metano, de metabolismo aerobio obligado. Este efecto puede contrarrestarse por una mayor disponibilidad de sustrato en suelos densificados, ya que se favorecen procesos anaeróbicos y podría aumentar la metanogénesis. Debido a que las bacterias metanótrofas presentan dos grandes grupos taxonómicos que difieren en su estrategia de vida (metanótrofas de tipo I o *Gammaproteobacteria* y de tipo II o *Alphaproteobacteria*), el ambiente agrícola también altera la composición de este grupo funcional.

*Predicciones: Los suelos cultivados presentarían una menor abundancia de metanótrofos (observada a través del número de copias de genes marcadores para este grupo funcionales) que los suelos prístinos, y estas diferencias podrían exacerbarse con el tiempo bajo uso agrícola, aunque también podrían debilitarse debido a una potencial mayor disponibilidad de metano en suelos cultivados. Los suelos cultivados también presentarían mayor abundancia de metanótrofos de tipo II, en relación a los de tipo I, que los suelos prístinos, ya que son más tolerantes a condiciones estresantes.*

- Los eventos de estrés hídrico alteran la estructura y función de las CMS, y el impacto de este efecto está asociado a sus características y la de los suelos que habitan. Los suelos agrícolas, dada su mayor exposición a condiciones atmosféricas, albergan comunidades más adaptadas a eventos de estrés hídrico. Para algunas variables, la mayor biomasa y diversidad microbiana esperable en suelos prístinos podría compensar esta menor adaptación.

*Predicciones: comunidades microbianas de suelos agrícolas presentarían mayor resistencia y capacidad de recuperación de su estructura (biomasa y composición) y funcionalidad ante la imposición de un evento de estrés hídrico. Comunidades de suelos prístinos presentarían mayor resistencia y/o capacidad de recuperación para algunas de las variables de estructura o función mencionadas.*



## **CAPÍTULO 2**

**BIOMASA Y FUNCIONALIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL  
SUELO EN UNA CRONOSECUENCIA AGRÍCOLA DEL NOA**



## 1 - Introducción

En el Capítulo 1 se trataron los aspectos más relevantes del fenómeno del cambio en el uso de la tierra y sus implicancias sobre el sistema suelo. Esta introducción se centrará en los estudios en cronosecuencia y su aplicación al estudio de las comunidades microbianas del suelo.

### 1.1 - Antecedentes y presentación del problema

En los últimos años, aumentó considerablemente el número de trabajos en ecología microbiana de suelos y, en el marco de cambio en el uso de la tierra, muchos autores reportaron diferencias en estructura y función de las comunidades microbianas del suelo (CMS) al comparar sitios prístinos y cultivados aledaños (*e.g.*, Bossio *et al.* 2005; Nogueira *et al.* 2006; Upchurch *et al.* 2008; Montecchia *et al.* 2011; Navarrete *et al.* 2013; Rodrigues *et al.* 2013; Brackin *et al.* 2013). Se encontraron, por ejemplo, menores niveles de biomasa, respiración y actividad enzimática en suelos cultivados al compararlos con suelos prístinos adyacentes (*e.g.*, Nogueira *et al.* 2006; Trasar-Cepeda *et al.* 2008; Chaer *et al.* 2009a; Bissett *et al.* 2011). Sin embargo, se conoce menos sobre la dinámica de las comunidades microbianas una vez acontecido el desmonte y luego de sucesivos años bajo cultivo. Este enfoque no sólo es relevante por la magnitud de la problemática del desmonte de tierras prístinas sino también porque se trata de un enfoque que permite comprender la dinámica de degradación, resistencia o resiliencia, según sea el caso, de la microbiota de esos suelos.

Una forma de comprender esta dinámica es a través de estudios en cronosecuencia, que podrían resultar útiles para detectar patrones temporales o estadios críticos. Las cronosecuencias son sustituciones espacio por tiempo que contribuyen a inferir sobre dinámicas temporales cuando los estudios de largo plazo no son viables (Walker *et al.*, 2010). En este sentido, la selva pedemontana de Yungas posibilita un estudio de este tipo gracias al avance progresivo de la actividad agrícola sobre estas tierras prístinas (Gasparri y Grau, 2009; Viglizzo *et al.*, 2011), que determinó la presencia actual de lotes productivos con diferente antigüedad de uso y relictos de selva pedemontana.

Las cronosecuencias han sido ampliamente utilizadas en estudios de pedogénesis o gradientes sucesionales, en este último caso con mayor frecuencia en macroecología, aunque con un aumento considerable de trabajos en ecología microbiana en los últimos años (*e.g.*, Orwin *et al.*, 2006; Kuramae *et al.*, 2010; Dini-Andreote *et al.*, 2014; Freedman y Zak, 2015; Trahan *et al.*, 2015). Moore-Kucera y Dick (2008) plantearon una cronosecuencia de reforestación en plantaciones forestales. No obstante, son poco frecuentes los trabajos de cronosecuencias agrícolas (*i.e.*, estudiando el efecto del tiempo bajo cultivo en suelos desmontados). Existen algunos estudios enfocados en el comportamiento de propiedades físico-químicas de los suelos, como el contenido de carbono orgánico o nutrientes (*e.g.*, Sá *et al.*, 2001; Lemenih *et al.*, 2005; Kimetu *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010; Moebius-Clune *et al.*, 2011; Bahr *et al.*, 2014), y otros en ecología microbiana de suelos (Gomez *et al.*, 2000; An *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2012; Eleftheriadis y Turrión, 2014; Tischer *et al.*, 2014a; Montecchia *et al.*, 2015). Dado el contexto particular de cada estudio, algunos de ellos se enfocan en la implementación de sistemas pastoriles y no cultivos extensivos (Melo *et al.*, 2012; Tischer *et al.*, 2014b), con lo cual la información disponible sobre la dinámica de las comunidades microbianas del suelo en sistemas de desmonte para la agricultura es escasa.

Los estudios de comunidades microbianas de suelos en el marco de cambio en el uso de la tierra, sea o no una cronosecuencia, presentan una debilidad adicional: la mayoría están

planteados en un esquema de muestreo que incluye un único lote agrícola o sitio prístino como referente de una situación particular, además de que algunos utilizan lotes que difieren en su manejo. La mayor frecuencia de ese tipo de esquemas se debe a que pertenecen a estudios observacionales, como éste, donde los factores a evaluar no pueden ser manipulados y la aleatorización está limitada a la toma de muestras. Un muestreo de este tipo resulta útil para un primer acercamiento a la situación, pero presenta menor potencia a la hora de sacar conclusiones sobre la respuesta de las comunidades microbianas al fenómeno en cuestión. Esto se debe a que, a pesar de que la inmensa heterogeneidad del sistema suelo y de sus comunidades microbianas aporta valor a las réplicas de un mismo sitio, no deja de tratarse de zonas sometidas a un manejo común o simplemente agrupadas espacialmente, sin independencia entre sí. Debido a que este tipo de estudios observacionales arroja información valiosa por ser representativos de situaciones reales, estas limitantes invitan a encarar estudios a partir de unidades experimentales independientes de una misma situación y/o análisis estadísticos que permitan lidiar con esta falta de independencia en la jerarquía espacial.

## 1.2 - Justificación

Éste es un estudio en profundidad sobre las comunidades microbianas de suelos de la ecorregión de Yungas en términos de su respuesta al cambio en el uso de la tierra y su dinámica posterior al desmonte. En años anteriores se realizó un estudio exploratorio que constituyó un primer acercamiento a la situación. Con este estudio se buscó profundizar tanto a nivel de las variables estudiadas como a nivel del diseño de muestreo.

Su ejecución se fundamenta en los siguientes hechos:

- en una región donde el desmonte desmedido es una problemática vigente, el estudio de los microorganismos del suelo permite indagar sobre la repercusión de este fenómeno sobre la salud de los suelos.
- son escasos los estudios en cronosecuencia enfocados en las comunidades microbianas del suelo y en el efecto del cambio en el uso de la tierra.
- los estudios en cronosecuencia facilitan el estudio de largas escalas de tiempo, en las cuales el seguimiento temporal resulta de difícil ejecución, aun cuando presentan mayores dificultades en la interpretación de los resultados, principalmente porque debe contemplarse la heterogeneidad espacial.
- el avance progresivo de la superficie cultivada en el noroeste argentino, y particularmente en el departamento de Anta elegido para este estudio, ofrece un esquema de trabajo idóneo, con sitios con diferentes niveles de historia agrícola aledaños a sitios prístinos mantenidos como cortinas de pedemonte o remanentes sin desmontar.
- el manejo de los cultivos relativamente uniforme que se realiza en la zona permitió elaborar un esquema de cronosecuencia sobre tres fincas diferentes, sumando potencia al análisis encarado. La mayoría de trabajos publicados al momento no presentan este tipo de diseño, sino que cada situación está representada por un único sitio.

## 1.3 - Objetivos

- Aplicando un esquema de muestreo en cronosecuencia (*i.e.*, sustitución espacio-tiempo) en diferentes fincas productivas, evaluar las modificaciones en la biomasa y funcionalidad de las CMS que surjan como resultado del desmonte y el tiempo bajo uso agrícola.

- Relacionar los datos microbiológicos obtenidos con las propiedades físico-químicas del suelo, a fin de integrar la interpretación de los resultados.

#### 1.4 - Hipótesis y predicciones

- El desmonte y la actividad agrícola imprimen un disturbio sobre el sistema suelo, el cual impacta en sus comunidades microbianas alterando su biomasa y funcionalidad. Las mayores alteraciones en las comunidades microbianas se observan con posterioridad al desmonte, ya que allí es cuando ocurren los cambios más drásticos en términos de cobertura vegetal y dado que en esa etapa se realizan un gran número de labores de preparación del suelo que imprimen un gran disturbio. Luego de una larga historia de uso agrícola similar, las CMS se adaptan al nuevo ambiente edáfico y no son alteradas por subsecuentes años de prácticas agrícolas.

*Predicciones: En comparación con suelos prístinos, suelos bajo cultivo presentarían menor biomasa total, junto con una menor respiración, actividad hidrolítica, capacidad de utilización de sustratos carbonados y diversidad funcional. Las variables medidas se estabilizarían en ciertos niveles luego de sucesivos años de cultivo bajo el mismo manejo, siendo similares entre suelos agrícolas de diferente antigüedad. Este patrón se observaría, en mayor o menor medida, independientemente de la finca analizada.*

- Las propiedades físico-químicas de los suelos estudiados se alteran con el cambio en el uso de la tierra y el uso agrícola, también en respuesta a cambios en la cobertura vegetal y a las prácticas agrícolas, aunque con una menor sensibilidad que sus comunidades microbianas. A su vez, las propiedades físico-químicas más sensibles pueden acompañar los cambios observados en las CMS en la cronosecuencia bajo estudio, ya que caracterizan su medio abiótico y se encuentran en constante interacción con éstas.

*Predicciones: Los suelos cultivados presentarían menor contenido de materia orgánica y nutrientes, y estos cambios se observarían más tardíamente que los cambios observados a nivel de las CMS. Otras propiedades físico-químicas como pH y textura podrían diferir entre suelos prístinos y cultivados, en particular aquellos con mayor historia de uso agrícola. Por la interacción entre medio biótico y abiótico, y a pesar de las diferencias en sensibilidad, se espera encontrar correlaciones entre estos grupos de variables.*

## 2 - Materiales y métodos

### 2.1 - Descripción del área bajo estudio

El muestreo se realizó en fincas cercanas a las localidades de Las Lajitas y Piquete Cabado, departamento de Anta, provincia de Salta. Esta zona coincide con un área de relieve suavemente ondulado de selva pedemontana de Yungas. La selva pedemontana, también conocida como selva de transición (con el Bosque Chaqueño Semiárido), presenta un gradiente E-O tanto altitudinal (700-400 m snm) como de precipitaciones (1000-700 mm año<sup>-1</sup>). El clima es subtropical con estación seca, con una temperatura media de 26,5°C en verano y de 14°C en invierno. La vegetación natural del pedemonte de Yungas presenta como especies dominantes el palo blanco (*Calycophyllum multiflorum*), palo amarillo (*Phyllostylon rhamnoides*), lapacho rosado (*Tabebuia impetiginosa*), cebil (*Anadenanthera colubrina*) y quina (*Myroxylon peruiferum*), entre otras, mientras que

hacia el este las precipitaciones disminuyen y predominan especies de Chaco Semiárido como *Aspidosperma* spp., *Schinopsis* spp. (Brown *et al.*, 2009).

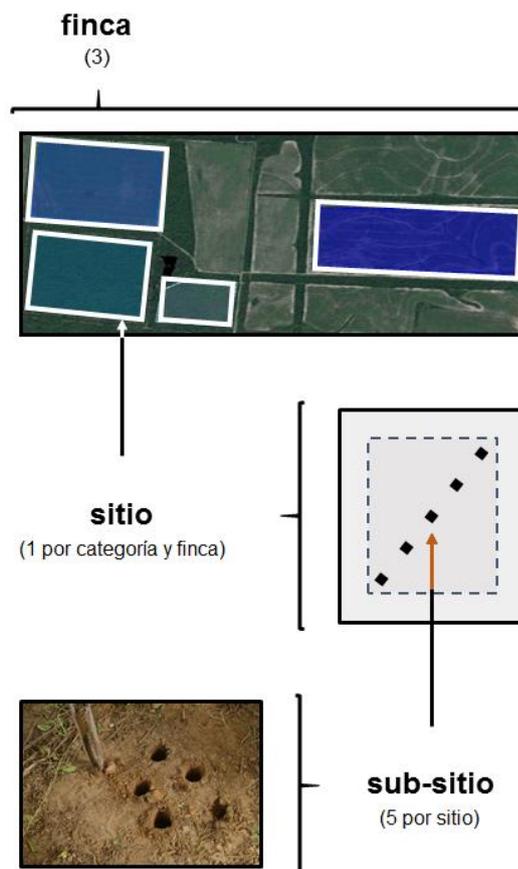
La actividad agropecuaria principal en la zona son los cultivos anuales, con preponderancia del cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Los cultivos de invierno más frecuentes son el cártamo (*Carthamus tinctorius*) y el trigo (*Triticum aestivum*), en general en doble cultivo con la soja. Alrededor del año 2010 aumentó la superficie sembrada con maíz (*Zea mays*), utilizado como cultivo de rotación de la soja (MAGyP). Como se explicó en el capítulo introductorio, la agricultura extensiva en esta zona se estableció y se establece sobre tierras prístinas desmontadas para tal fin, un fenómeno que se impulsó alrededor de 1980 y mantuvo su crecimiento hasta la actualidad. Esto determinó la presencia de lotes productivos de diferente antigüedad, en su mayoría entre 5 y 30 años desde el desmonte, rodeados por remanentes de pedemonte a modo de cortinas. Por su origen común, todos los lotes productivos estudiados han pasado por un mismo tratamiento; las tareas de desmonte (remoción y quema de material, roturación del suelo) y dos años de cultivo bajo manejo de labranza convencional, que facilitan la incorporación y mineralización del material remanente, así como permiten lidiar con las irregularidades en el terreno consecuencia del desmonte (Matías Michel, Consorcio “Los Tapires”, comunicación personal). El manejo por siembra directa se implementó hace alrededor de 15 años, pero esos dos primeros años bajo labranza convencional siguen realizándose por las razones antedichas. Durante varios años la soja fue cultivada en todas las campañas y en los últimos años se ha comenzado a implementar la rotación con maíz con intenciones de evitar los perjuicios ligados al monocultivo (Javier Martín, Grupo Lajitas, comunicación personal).

Los suelos de Las Lajitas pertenecen casi en su totalidad a una asociación que lleva el mismo nombre (Lj) y son suelos que deben su origen a depósitos de conos aluviales en los que se habría impuesto, parcialmente, la acción de los ríos de la subcuenca de los ríos Dorado y Del Valle (INTA – Elena, 2012). La serie dominante en Lj es Las Lajitas, constituida por Argiustoles údicos caracterizados por su fuerte desarrollo, textura media en superficie, contenido de materia orgánica moderadamente alto, pH desde moderadamente ácido a fuertemente alcalino y pendiente del 0 al 1%. Sus características los hacen susceptibles a la erosión ligera y, ocasionalmente, a un ligero impedimento del drenaje. Como suelos subordinados se presentan los Ustipsamientos típicos de la serie Apolinario Saravia y los Hapludalfes típicos de la serie Mollinedo. El proyecto de desarrollo metodológico y operativo para el relevamiento, correlación y evaluación de tierras de Las Lajitas, ejecutado en el INTA, servirá como fuente de información adicional sobre los suelos presentes en la región (Paoli *et al.*, 2009; Elena, 2012).

## **2.2 - Muestreo y almacenamiento**

Las muestras de suelo se tomaron en los años 2011 y 2013, a principios del mes de mayo, en las fincas mencionadas en el Cuadro 1. Se seleccionó esta época del año debido a que coincide con el final de la época de lluvias, con lo cual el contenido de humedad en el suelo, junto con las temperaturas moderadas, asegura condiciones óptimas para la actividad microbiana.

El diseño de muestreo fue el mismo en ambos años, según se describe a continuación y se representa en el esquema de la Figura 2. El muestreo se realizó en 3 fincas productivas con similares esquemas de manejo y tipo de suelo. Dentro de cada finca se seleccionaron 4 ambientes o sitios, los cuales representaron una cronosecuencia de uso agrícola que incluyó el suelo prístino (referencia) y suelos cultivados con 3 categorías de tiempo bajo uso agrícola (Cuadro 1). En el año 2011 las categorías fueron 3-5, 11-14 y 28-30 años de historia agrícola, esta última representando a los suelos con mayor antigüedad de cultivo de la zona. Todos estos sitios habían sido sembrados con soja en el verano 2010/11 pero en dos de ellos la soja había sido cosechada y ya estaba sembrado el trigo del invierno entrante (Cuadro 1). En 2013, a los suelos agrícolas se les sumaron los dos años transcurridos entre muestreos (*i.e.*, 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso). En ambos muestreos se seleccionaron 5 sub-sitios dentro de cada sitio y, en cada uno de ellos, se recolectó una muestra compuesta de varias sub-muestras tomadas con barreno (aprox. 1 kg de muestra). Esto determinó que se tengan: 3 fincas, 4 sitios  $\text{finca}^{-1}$  y 5 sub-sitios  $\text{sitio}^{-1} = 60$  sub-sitios (15 por categoría de uso agrícola) (Figura 2). Los sub-sitios se tomaron a intervalos de 50 m, en los sitios agrícolas sobre una transecta diagonal y en los sitios prístinos, dado que en general correspondieron a cortinas de monte de no más de 100 metros de ancho, sobre una transecta en zigzag demarcada en la zona central (*i.e.*, la más alejada del suelo cultivado).



**Figura 2.** Esquema representando el diseño de muestreo utilizado en 2011 y 2013. *Nota: la imagen del sub-sitio es esquemática; se tomaron tantas muestras como fueran necesarias para llegar a 1 kg de suelo.*

Siguiendo el protocolo de estudios preliminares, las muestras se tomaron del entresurco en los sitios agrícolas o evitando puntos cercanos a raíces en los sitios prístinos. Con el mismo criterio se escogió la profundidad de muestreo, a 0-15 cm, zona del perfil de suelo con mayor número y actividad de microorganismos y que ha demostrado ser adecuada para análisis comparativos en la región (Montecchia *et al.*, 2011). Pese a esta decisión, en el muestreo de 2013 la profundidad se vio reducida a 0-10 cm debido a un fuerte déficit hídrico (Figuras S1, S2 y S3) y a la presencia de un horizonte densificado ubicado a esa profundidad. Mientras que en 2011 las muestras de suelo presentaron entre un 11 y un 17% de humedad gravimétrica, en 2013 esta variable se cuantificó como nula en todas las muestras, sin variaciones de peso seco luego de secar en estufa por 7 días (Figura S3).

Los sitios prístinos fueron representados por zonas no desmontadas, algunas de las cuales funcionan como cortinas naturales de pedemonte. Los sitios agrícolas, por su parte, correspondieron a lotes productivos de entre 45 y 75 has de superficie, aproximadamente, salvando un lote de mayor tamaño donde se demarcó una sección (Cuadro 1). En las muestras de 2013 no se incluyó el sitio de 5 años de la finca IS, debido a que durante el muestreo se confundió con un sitio aledaño de diferente antigüedad.

Las muestras acondicionaron en cajas térmicas para luego ser transportadas al laboratorio. Allí fueron tamizadas con malla de 2 mm y sometidas a una pre-incubación de 7 días a 14°C, la cual se utiliza frecuentemente como proceso de estandarización (Bloem *et al.*, 2006). Luego de este período, se conservaron a 4°C hasta el momento del análisis. En ambos muestreos fueron tenidos en cuenta los registros climatológicos y las características del cultivo (especie, estado fenológico, rendimiento alcanzado o estimado, etc.). En muchos casos los datos fueron provistos por Matías Michel, administrador del Consorcio “Los Tapires”.

### **2.3 - Propiedades físico-químicas**

El análisis físico-químico de las muestras de suelo fue realizado en el Laboratorio de Suelo y Agua de la E.E.A. Salta del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Según protocolos estandarizados (Sparks *et al.*, 1996), se determinó carbono orgánico total (micro Walkley-Black), nitrógeno total (micro Kjeldahl), fósforo extractable (Bray-Kurtz), fracciones texturales (Bouyoucos), pH (en agua, relación 1:2,5), conductividad eléctrica, contenido hídrico en saturación y cationes de intercambio ( $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ ). Asimismo, se estimó el C lábil como carbono orgánico extraíble con  $K_2SO_4$ , obtenido durante la determinación de carbono de la biomasa microbiana. En las muestras del año 2011, el análisis se realizó sobre muestras compuestas de los 5 sub-sitios para cada sitio, mientras que para las muestras de 2013 se analizaron por separado 3 sub-sitios por sitio.

Dado que algunos análisis requirieron trabajar a un contenido de humedad del 60% de la capacidad de campo (CC), se realizó la estimación del contenido gravimétrico de agua a CC mediante membrana de Richards. Esto fue posible gracias a una colaboración con el Laboratorio de Terramecánica e Implantación de Cultivos del INTA Castelar (código de proyecto: PNIND-1108074).

**Cuadro 1.** Descripción de los sitios muestreados

Finca <sup>(1)</sup>	Años de uso (al 2011)	Coordenadas	Superficie sitio <sup>(2)</sup> (ha)	Cultivo al momento del muestreo	
				2011	2013
<b>IS</b>	30	24°52'31"S, 64°11'38"O	45	Soja cosechada	Soja cosechada
	13	24°52'28"S, 64°11'59"O	57	Soja cosechada	Soja cosechada
	3	24°51'47"S, 64°14'51"O	15 <sup>(3)</sup>	Soja en pie	<i>n.d.</i>
	0	24°52'25"S, 64°12'10"O	6	<i>n.c.</i>	<i>n.c.</i>
<b>PC</b>	30	24°52'41"S, 64°18'58"O	74	Soja en pie	Maíz en pie
	11	24°51'41"S, 64°18'41"O	46	Soja en pie	Soja cosechada
	5	24°51'40"S, 64°19'03"O	47	Soja en pie	Soja cosechada
	0	24°51'52"S, 64°19'05"O	5	<i>n.c.</i>	<i>n.c.</i>
<b>LR</b>	28	24°48'41"S, 64°11'49"O	50 <sup>(4)</sup>	Trigo emergiendo (ant. soja)	Soja cosechada
	14	24°48'02"S, 64°16'06"O	37	Trigo emergiendo (ant. soja)	Soja cosechada
	4	24°48'33"S, 64°18'05"O	30	Soja en pie	Soja cosechada
	0	24°48'43"S, 64°18'11"O	3	<i>n.c.</i>	<i>n.c.</i>

<sup>(1)</sup> IS: Isandrea; PC: Puesto Cristo; LR: La Reina.

<sup>(2)</sup> Superficie seleccionada para el muestreo. En el caso de sitios agrícolas, corresponde a la superficie del lote productivo, con las excepciones descriptas a continuación.

<sup>(3)</sup> Sección de un sitio que fue desmontada con posterioridad al resto del lote.

<sup>(4)</sup> Sección de un lote de 244 ha.

Todos los cultivos en pie se encontraban en estado de madurez ya que eran cultivos de verano.

Los sitios prístinos corresponden a cortinas de monte de igual ancho y de una longitud equivalente a la del lote aledaño.

*n.d.*: no disponible; *n.c.*: no corresponde; *ant.*: cultivo antecesor

## 2.4 - Variables microbianas

Para caracterizar la biomasa microbiana y su funcionalidad, se utilizaron principalmente metodologías de bioquímica de suelos conocidas como tradicionales. Las variables de funcionalidad utilizadas estiman la actividad microbiana potencial. En todos los casos se trabajó por triplicado, realizando una pre-incubación de 24 h a 25°C para atenuar el efecto del almacenamiento a 4°C.

### 2.4.1 - Biomasa microbiana

Se calculó el carbono de la biomasa microbiana (CBM) según el método de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987; ISO-*standard* 14240-2, 1997). El principio del método es la muerte y lisis de células microbianas por fumigación con cloroformo, seguida de la extracción y cuantificación del carbono orgánico (CO) liberado. El carbono microbiano se obtiene de la diferencia entre el CO extraído de muestras fumigadas y no fumigadas.

Brevemente, a muestras de suelo (25 g) fumigadas y no fumigadas con cloroformo (cada set por triplicado) se les extrajo el CO con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M en una relación 1:4 (p/v) de suelo:extractante. Los extractos se agitaron a 200 rpm durante 30 minutos, se filtraron con papel tipo Whatman N°42 (cuantitativo, libre de ceniza) y se almacenaron a -20°C. Para la determinación del CO en los extractos se realizó una digestión ácida basada en el método del Walkley-Black. Brevemente, a 8 ml de extracto se les agregó 1,5 ml de dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1N) y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para luego incubar en baño térmico a 95°C durante 30 minutos. Estas muestras se titularon luego con sal de Mohr 0,1 N ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), utilizando ferroína como indicador redox. El CBM se calculó como:  $CBM (\mu g g^{-1}) = (CO_F - CO_{NF}) * k_{EC}^{-1}$ , donde: CO<sub>F</sub> y CO<sub>NF</sub> = CO extraído de suelo fumigado y no fumigado, respectivamente; y k<sub>EC</sub> = factor de conversión que corrige por la eficiencia del método. Se utilizó un k<sub>EC</sub> de 0,38 propuesto por Vance *et al.* (1987) y avalado por Joergensen (1996).

### 2.4.2 - Funcionalidad microbiana

#### 2.4.2.1 - Respiración basal

Dado que la respiración es el proceso metabólico a partir del cual los organismos aeróbicos oxidan la materia orgánica para obtener energía, su medición puede ser utilizada como un estimador de la actividad global de las comunidades microbianas presentes en el suelo. La respiración microbiana puede ser estimada a partir de la emisión de CO<sub>2</sub>, ya que puede determinarse con mayor precisión que el consumo de O<sub>2</sub> y que prácticamente todo el CO<sub>2</sub> emitido por una muestra de suelo provendrá de la actividad microbiana, con un aporte insignificante de procesos abióticos en suelos no calcáreos (Alef, 1995a). Incubando las muestras a una humedad del 60% CC se evitan las condiciones de anaerobiosis y, por ende, procesos fermentativos o de respiración anaeróbica que puedan alterar la determinación de CO<sub>2</sub>. En ausencia de luz, por otra parte, se evitan posibles subestimaciones por acción de organismos fotosintéticos.

La respiración basal (RB) (*i.e.*, sin adición sustratos carbonados) se determinó por el método estático de “respiración por titulación” desarrollado por Isermeyer (1952) y comprendido en la ISO-*standard* 16702:2002 (Alef, 1995a). Esta metodología está basada en la incubación de muestras de suelo en recipientes herméticos en presencia de una solución de hidróxido de sodio (NaOH), la cual captura el CO<sub>2</sub> formándose carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). El CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> formado precipita en presencia de cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>)

y el NaOH remanente (que no reaccionó con CO<sub>2</sub>) se titula con una solución de HCl hasta la neutralización (detectada por viraje del indicador de fenolftaleína). La diferencia entre el volumen de HCl utilizado en los tratamientos blanco (sin suelo) y el utilizado en las muestras con suelo equivale al volumen de NaOH que reaccionó con el CO<sub>2</sub> producido por el suelo. Finalmente, un factor de conversión adaptado a la molaridad de las soluciones utilizadas traduce ese volumen a mg de CO<sub>2</sub>.

Cada muestra de suelo (25 g) se incubó al 60% CC en frascos herméticos durante 72 h, en condiciones de oscuridad y a 25°C, junto con una trampa de NaOH 0,05M. Una vez finalizado el período de incubación, a cada trampa de NaOH se le agregaron 2 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,5M y se tituló con HCl 0,05M, previa incorporación de una solución de fenolftaleína 60% en etanol como indicador. La RB (mg CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se calculó como:  $(V_o - V) * F_c * P_{ss}^{-1} * t^{-1}$ , donde: V<sub>o</sub> = volumen promedio de HCl (ml) utilizado en la titulación de los tratamientos blanco, V = volumen de HCl (ml) utilizado en la muestra de suelo, F<sub>c</sub> = factor de conversión (mg CO<sub>2</sub> ml<sup>-1</sup> NaOH), P<sub>ss</sub> = peso seco de un gramo de suelo húmedo y t = tiempo de incubación.

#### 2.4.2.2 - Actividad inducida por sustrato

La actividad inducida por glucosa se analizó a través de dos variables, la respiración inducida por sustrato y la actividad deshidrogenasa. Ambas variables fueron incorporadas a modo accesorio en 2013, con el objetivo de complementar los datos de respiración basal, ya que estiman la actividad microbiana en una situación sin limitación de sustrato. Debido a que fueron variables de carácter complementario, sólo se determinaron en 3 sub-sitios por sitio, seleccionando aquellos en los que se habían realizado determinaciones físico-químicas.

##### *Respiración inducida por sustrato*

La respiración inducida por sustrato o SIR (siglas del inglés, *substrate-induced respiration*) surge de la cuantificación del CO<sub>2</sub> emitido por una muestra de suelo luego de la adición de una cantidad conocida de glucosa. La cantidad de sustrato agregado y las condiciones de incubación se ajustaron experimentalmente siguiendo antecedentes bibliográficos (Lin y Brookes, 1999; Degens *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2004). La determinación se realizó en de 25 ml con cierre hermético, colocando 1 g de suelo (equivalente en peso seco) y 2 ml de solución de glucosa 0,5% (10 mg glucosa g<sup>-1</sup> suelo). Para cada tratamiento se preparó una muestra basal con 2 g de suelo y 4 ml de agua destilada estéril. Las muestras se incubaron a 25°C durante 4 h, con agitación al inicio, a los 90 minutos e inmediatamente antes de la medición. El CO<sub>2</sub> producido en el período de incubación se determinó por la técnica de *headspace* en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (servicio de la cátedra de Bioquímica, FAUBA). Los resultados se expresaron en valores absolutos (µg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> suelo h<sup>-1</sup>) y como respuesta al agregado de glucosa, como diferencia porcentual con la muestra basal (SIR-rta = (glucosa - basal) basal<sup>-1</sup> \* 100).

##### *Actividad deshidrogenasa*

A diferencia de SIR, aquí no se está cuantificando la cantidad de CO<sub>2</sub> emitido sino la actividad de las deshidrogenasas, enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, removiendo dos átomos de hidrógeno de su sustrato y entregándolos a un aceptor o una coenzima (Margesin, 2005). Al ser en su mayoría intracelulares, se considera que las deshidrogenasas reflejan la actividad de microorganismos fisiológicamente (Rossel *et al.*,

1997). Para realizar esta determinación se siguió la metodología de Thalmann (1968) con modificaciones basadas en Öhlinger (1996). En esta metodología, las muestras de suelo se incuban en presencia de un aceptor de electrones artificial, el trifenil-tetrazolio, y se cuantifica su producto de reducción, el trifenil-formazán (TFF), por espectrofotometría.

Brevemente, a 5 g de suelo se les agregó 5 ml de una solución de cloruro de trifenil-tetrazolio 1% (en buffer Tris 0,1 M, pH 7,6) y 2 ml de glucosa 1% (en el mismo buffer Tris) para estandarizar la disponibilidad de fuentes carbonadas. Se agitó en vórtex y se incubó en oscuridad a 30°C durante 24 h. Luego del período de incubación, a cada muestra se le agregó 25 ml de acetona y se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm durante 2 h y en oscuridad. Luego de centrifugar (4500 rpm/5634 g, 4°C, 10 minutos) y recuperar el sobrenadante, se midió la absorbancia a 546 nm para determinar la concentración de TFF, producto de la reacción. Para ello se realizó una curva de calibración con soluciones de 0-100  $\mu\text{g TFF ml}^{-1}$ . Por cada tratamiento se incluyó un control sin agregado de sustrato y, a su vez, en cada tanda de medición se incorporaron dos blancos con todas las soluciones correspondientes, pero sin agregado de suelo. De este modo, se contemplaron tanto posibles interferencias de la coloración del suelo como de la degradación espontánea del sustrato.

### **2.4.2.3 - Actividad hidrolítica**

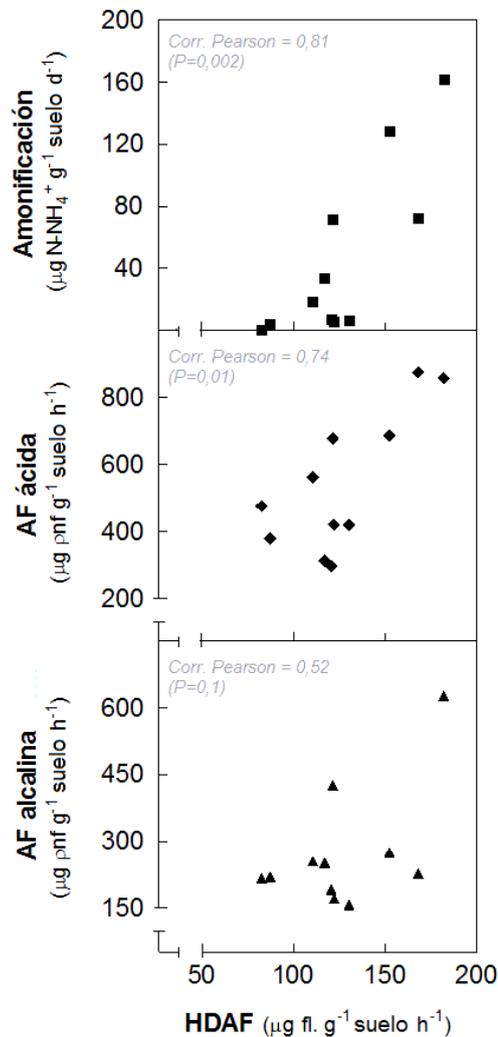
En las muestras del año 2011 se determinó amonificación y actividad fosfatasa (AF) ácida y alcalina, como indicadores de la mineralización potencial de nitrógeno y fósforo, respectivamente. En las muestras de 2013, en cambio, se decidió abarcar la actividad hidrolítica global con una única variable, la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (HDAF), con el objetivo de reducir el costo operativo y económico de los análisis. Con el objetivo de comparar las variables de actividad hidrolítica utilizadas en 2011 y la HDAF, se calculó la correlación entre estas variables (Figura 3). Los datos de HDAF de 2011 de esta figura provienen de un experimento no incluido en esta tesis y se obtuvieron de muestras compuestas de cada sitio.

### ***Amonificación***

La amonificación es un proceso de conversión de N orgánico a inorgánico, principalmente en forma de amonio, y por ello se utiliza como estimador de la mineralización de N (Alef, 1995b; Kandeler, 1996). La liberación de amonio es llevada a cabo por un gran número de microorganismos heterotróficos, en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas (Alef, 1995b; Kandeler, 1996; Nannipieri y Paul, 2009). Se determinó por incubación del suelo en condiciones de anaerobiosis por saturación hídrica (Kandeler, 1996), inhibiéndose así la nitrificación para poder cuantificar el  $\text{NH}_4^+$  producto de la amonificación a través de una versión modificada de la reacción de Berthelot.

Muestras de 5 g de suelo (equivalente en peso seco) se incubaron con 15 ml de agua destilada durante 7 días a 40°C. Al final del período de incubación, se adicionaron 2 ml de KCl 2M, se agitó durante 30 minutos a 200 rpm y se centrifugó a 5000 rpm (6260 g). La determinación del contenido de amonio se realizó sobre 5 ml del sobrenadante obtenido, agregándole 1 ml de dicloroisocianurato de sodio y 2,5 ml de un reactivo compuesto de salicilato de sodio, nitroprusato de sodio y NaOH. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, para que adquiriera la coloración debida, y se midió su absorbancia a 660 nm. La curva de calibración se realizó con soluciones de 0-2,5  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ml}^{-1}$ . Los blancos consistieron en muestras de suelo con agua destilada incubadas a -20°C y, adicionalmente, blancos de la reacción de Berthelot

donde el extracto de suelo fue reemplazado por cantidades equivalentes de agua destilada y KCl 2M. Dadas las características del ensayo, los datos obtenidos representaron la amonificación neta, resultado de la mineralización y la inmovilización microbiana, procesos que en el suelo ocurren conjuntamente.



**Figura 3.** Relación entre las la hidrólisis de acetato de fluoresceína (HDAF) medida en 2013 y las actividades hidrolíticas medidas en 2011: amonificación, actividad fosfatasa (AF) ácida y AF alcalina. Se presenta el coeficiente de correlación de Pearson con su significancia estadística.

### Actividad fosfatasa ácida y alcalina

Las fosfatasas son enzimas ampliamente difundidas que catalizan la hidrólisis de uniones ésteres y anhídridos de ácido fosfórico (formas orgánicas), dando como producto fosfatos (forma inorgánica) que pueden ser aprovechados tanto por plantas como por microorganismos. Dentro de este grupo de enzimas, las fosfomonoesterasas son las más comúnmente estudiadas, en particular la actividad fosfatasa (AF) ácida y alcalina, la cual puede estimarse a través de la utilización de un sustrato artificial (Nannipieri *et al.*, 2011).

Para determinar la AF aquí se tomó como base el protocolo establecido por Dick *et al.* (1996). De acuerdo con éste, a cada muestra de 1 g de suelo se le agregó buffer universal modificado (MUB) y *p*-nitrofenil fosfato, un sustrato artificial específico. Luego de incubar durante 1 h a 37°C, se interrumpió la reacción con CaCl<sub>2</sub> y NaOH, se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos y se filtró con Whatman N°12 (se realizaron ambos para

evitar la presencia de un precipitado al momento de la medición). El producto de la reacción,  $\rho$ -nitrofenol (pnf), se determinó por espectrofotometría a 410 nm y la respectiva curva de calibración. Los dos tipos de tratamiento blanco consistieron en muestras sin agregado de sustrato y muestras sin suelo para contemplar el efecto de la hidrólisis espontánea y de la coloración del suelo, respectivamente. Los dos tipos de fosfatasa, ácida y alcalina, se determinaron utilizando soluciones buffer MUB a pH 6,5 y 11, respectivamente.

#### ***Hidrólisis de diacetato de fluoresceína***

La HDAF se considera estimadora de la capacidad hidrolítica global, ya que el diacetato de fluoresceína puede ser sustrato de esterasas intracelulares no específicas, así como de lipasas, esterasas y proteasas extracelulares (Shaw y Burns, 2006), las cuales están involucradas en la descomposición de la materia orgánica del suelo (Nannipieri *et al.*, 2003). La HDAF puede llevarse a cabo tanto por bacterias como hongos, algas y protozoos (Margesin, 2005).

Aquí la HDAF se determinó por el método descrito por Alef (1995c). Brevemente, a 1 g (equivalente en peso seco) de suelo se le adicionaron 50 ml de buffer fosfato 60 mM pH 7,6 y 0,5 ml de una solución diacetato de fluoresceína 4,9 mM. Previa agitación, las muestras se incubaron a 37°C durante 3 h. Luego del período de incubación, la reacción se detuvo adicionando 2 ml de acetona. Para remover las partículas de suelo, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm (10016 g) durante 5 minutos y posteriormente se filtraron con papeles de filtro tipo Whatman N°2 (cualitativo, 8  $\mu$ m, flujo medio). Por último, se determinó el producto final, la fluoresceína, por espectrofotometría midiendo a  $A_{490}$  y ajustando con una curva de calibración (0-0,01 mg fluoresceína ml<sup>-1</sup>). Los blancos fueron tratados del mismo modo, con la única diferencia de que se agregaron 0,5 ml de acetona en lugar del sustrato. También se incluyó un blanco sin suelo y con agregado de sustrato para contemplar la hidrólisis no enzimática del sustrato.

#### **2.4.2.4 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial**

Se aplicó la técnica de utilización de diferentes sustratos carbonados en microplacas, la cual es utilizada frecuentemente para el análisis de perfiles fisiológicos desarrollado por Garland y Mills (1991), más conocido como CLPP (del inglés, *Community Level Physiological Profiling*). Esta técnica permite la evaluación conjunta de la utilización de varios sustratos carbonados y, además de arrojar datos de CLPP, permite estimar la diversidad funcional y la utilización global de sustratos, dentro de ciertas restricciones asociadas al método (Zak *et al.*, 1994; Garland, 1999).

Para llevar a cabo la técnica de utilización de sustratos carbonados en microplacas, en las muestras de 2011 se utilizaron las EcoPlates™ de BIOLOG® (Haywarth, CA, EEUU), microplacas comerciales de 96 pocillos con 31 sustratos diferentes. Para las muestras de 2013, dado que el presupuesto no permitió acceder a las placas BIOLOG®, se utilizaron microplacas de 96 pocillos preparadas en el laboratorio. De acuerdo con un protocolo puesto a punto por el grupo de trabajo, se prepararon microplacas con 16 sustratos diferentes, cada uno en solución mineral basal y con violeta de tetrazolio como indicador redox (Sydorenko *et al.*, 2013) (Cuadro 2). No se incluyeron todos los sustratos presentes en las placas comerciales por la imposibilidad económica de acceder a ellos, y algunos se reemplazaron por otros.

**Cuadro 2.** Sustratos presentes en las microplacas utilizadas en 2013, clasificados según su estructura química

Ácidos carboxílicos	Polímeros	Aminas	Aminoácidos	Carbohidratos	Carbohidratos fosforilados
D-galacturónico	tween 20	putrescina	L-arginina	L-arabinosa	glucosa-1-fosfato
glutámico	tween 80		L-asparagina	D-glucosa	
itacónico			L-lisina	D-manosa	
valérico			L-triptófano	sacarosa	

Todos los pasos, desde el acondicionamiento y la pre-incubación hasta la siembra de las muestras de suelo en las microplacas, fueron realizados según Correa *et al.* (2009). Las placas se incubaron a 28°C y se determinó la absorbancia a 590 nm ( $A_{590}$ ) con un lector de microplacas Multiskan1 EX (Thermo). Las mediciones se realizaron a intervalos de 24 h durante 7 días, y se analizaron los datos hasta las 96 h, donde el valor de absorbancia promedio de los distintos pocillos alcanzó su máximo. En todos los casos, los valores obtenidos se estandarizaron con respecto al valor de  $A_{590}$  del tiempo 0. Asimismo, todas las lecturas de  $A_{590}$  menores a 0,1 fueron consideradas como nulas. A partir de estas microplacas, y en cada instancia de medición, se obtuvieron datos de consumo por sustrato y por grupo de sustratos (según Campbell *et al.*, 1997), y de consumo global como AWCD (*average well colour development*), una medida que promedia el consumo de todos los sustratos en cada muestra.

## 2.5 - Análisis de los datos

### 2.5.1 - Cálculo de cocientes e índices

Se calcularon cocientes que relacionaran las variables biológicas entre sí o con las variables físico químicas, tales como el cociente metabólico o  $qCO_2$  (Anderson, 2003), el cociente microbiano (CBM:CO) y la actividad enzimática específica (por unidad de CBM y/o CO, dependiendo de si se tratara de una actividad exclusivamente intracelular o también extracelular). Siguiendo lo propuesto por Zak *et al.* (1994), se calcularon índices de diversidad de utilización de sustratos carbonados en microplacas, utilizando para ello el software PAST (Hammer *et al.*, 2001). Entre ellos se seleccionaron los índices más frecuentemente utilizados: Riqueza, Dominancia, Shannon-Weaver (H) y Equitatividad ( $e^{H/S}$ ).

### 2.5.2 - Análisis estadístico

Para el análisis de estos datos se utilizaron tres softwares estadísticos: R 3.0.1 (R Core Team, 2014), Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014) y PAST (Hammer *et al.*, 2001). Todos los sets de datos y modelos fueron testeados por medio de herramientas gráficas para evaluar presencia de *outliers*, normalidad y homogeneidad de varianzas.

El efecto de los años de agricultura sobre las distintas variables se evaluó utilizando modelos mixtos lineales generalizados, con el paquete ‘nlme’ (Pinheiro *et al.*, 2015). La variable categórica «años» de uso agrícola, correspondiente al nivel jerárquico de «sitio», fue cargada como efecto fijo, mientras que tanto «finca» como «sub-sitio» se tomaron como efectos aleatorios. El modelo también consideró la jerarquía o anidamiento «finca>sitio>sub-sitio». A partir de estos modelos se realizaron análisis de varianza y test *post hoc* de Tukey (paquete ‘multcomp’ - Hothorn *et al.* (2008)).

Se llevaron a cabo distintos análisis multivariados de acuerdo a los sets de datos involucrados, debido a que no existe un consenso en la bibliografía internacional sobre el método a utilizar. En primer lugar, cada matriz de variables cuantitativas continuas (datos físico-químicos, bioquímicos y CLPP) se analizó con un análisis de componentes principales (ACP). Nuevamente, se realizaron sucesivos análisis con diferentes subsets de variables, con el objetivo de evaluar la capacidad descriptiva de cada una y la correlación entre ellas. En el caso de los datos de CLPP, las fuentes carbonadas fueron agrupadas en carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, aminas, polímeros, ácidos fenólicos y misceláneo, siguiendo la clasificación de Campbell *et al.* (1997). La interacción entre matrices de datos microbiológicos y físico-químicos se analizó con varios enfoques, empezando por el cálculo de coeficientes de correlación. También se testearon métodos multivariados más complejos que permitieran trabajar con ambas matrices de manera conjunta y simétrica (*e.g.*, análisis multifactorial o MFA, análisis de co-inercia o COIA), de los cuales se expondrán únicamente las salidas más explicativas.

### **3 - Resultados**

#### **3.1 - Propiedades físico-químicas del suelo: muestreos 2011 y 2013**

Las variables físico-químicas respondieron al uso agrícola de manera relativamente similar en los dos años (2011 y 2013), siendo algunas variables más sensibles que otras (Cuadros 3 y 4). El porcentaje de arena aumentó con el tiempo bajo uso agrícola, con consecuentes cambios en la capacidad de retención hídrica. Estas diferencias se presentaron en relación con el suelo prístino en 2011 y con el suelo de 5-7 años en 2013. En ese año, el aumento en el porcentaje de arena fue acompañada por una reducción en la fracción de limo. El CO disminuyó con el tiempo bajo uso agrícola pero esas diferencias fueron significativas a partir de los suelos con historia de cultivo intermedia (11-14/13-16 años de cultivo). Esa caída más tardía se encontró también para el N total.

El C lábil, medido como C extractable con  $K_2SO_4$  presentó diferencias entre años: en 2011 presentó gran variabilidad intra-sitio pero igualmente fue mayor en los suelos de corta historia agrícola; en 2013, el C lábil presentó una caída marcada entre el sitio prístino y el de 5-7 años de cultivo, con una tendencia a reducirse en sucesivos años. No se observó una respuesta consistente del P extractable en la cronosecuencia, salvando una tendencia a reducirse, en promedio, con los años de cultivo. Los valores de pH se mantuvieron siempre cercanos a la neutralidad y la CE mostró una reducción con los años de cultivo, siendo mayor en los suelos de monte que en agrícolas de 30-32 años.

**Cuadro 3.** Propiedades físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola (muestreo 2011). *Se presentan datos de muestras compuestas para cada ambiente por finca (IS, PC y LR) y el promedio con su correspondiente análisis estadístico.*

Variable <sup>(1)</sup>	IS				PC				LR				Promedio			
	0	3-5	11-14	28-30	0	3-5	11-14	28-30	0	3-5	11-14	28-30	0	3-5	11-14	28-30
Clase textural <sup>(2)</sup>	FL	FL	F	F	F	F	F	FA	F	F	FA	FA				
Arena (%)	22	38	33	47	48	40	38	56	34	40	65	64	34,8 b	39,3 ab	45,3 ab	55,7 a
Limo (%)	55	50	46	37	39	44	49	33	49	46	25	27	47,7 a	46,7 a	40,0 a	32,3 a
Arcilla (%)	23	12	21	16	13	16	13	11	17	14	10	9	17,5 a	14,0 a	14,7 a	12,0 a
CHS (%)	43	32	31	28	33	32	33	29	29	30	25	26	35 a	31 ab	30 ab	28 b
pH	5,7	8,0	6,5	6,8	7,5	6,2	7,5	6,6	7,0	7,3	6,5	6,7	6,7 a	7,2 a	6,8 a	6,7 a
CE (mmhos cm <sup>-1</sup> )	0,44	0,80	0,24	0,36	0,92	0,28	0,80	0,16	1,08	1,04	0,16	0,32	0,8 a	0,7 a	0,4 a	0,3 a
CO (%)	2,53	2,11	1,30	1,34	2,03	1,73	1,57	1,27	3,66	2,73	1,17	0,97	2,7 a	2,2 ab	1,3 b	1,2 b
C lábil (mg kg <sup>-1</sup> )	45	133	45	63	44	103	83	53	129	154	66	74	73 b	130 a	65 b	63 b
N total (%)	0,20	0,18	0,14	0,10	0,18	0,17	0,14	0,10	0,37	0,27	0,10	0,07	0,25 a	0,21 a	0,13 b	0,09 b
C:N	12	12	9	13	11	10	11	12	10	10	12	13	11 a	11 a	11 a	13 a
P (mg kg <sup>-1</sup> )	62	55	31	29	45	16	26	8	119	114	5	12	75 a	62 a	21 a	16 a
C:P	411	384	419	462	451	1081	604	1587	308	239	2340	808	390 a	568 a	1121 a	952 a
K (meq kg <sup>-1</sup> )	15,0	18,5	13,6	12,2	10,7	9,1	2,4	8,2	5,9	3,2	6,8	5,8	1,1 a	1,0 a	0,8 a	0,9 a
Na (meq kg <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1 a	0,1 a	0,1 a	0,1 a
Ca (meq kg <sup>-1</sup> ) <sup>(3)</sup>	110	n.d.	107	108	n.d.	108	n.d.	86	21,7	n.d.	75	78				
Mg (meq kg <sup>-1</sup> ) <sup>(3)</sup>	51	n.d.	35	24	n.d.	32	n.d.	21	57	n.d.	16	32				

<sup>(1)</sup> CHS: contenido hídrico en saturación; CE: conductividad eléctrica; CO: carbono orgánico total; P ext.: fósforo extractable

<sup>(2)</sup> F: franco, L: limoso, A: arenoso.

<sup>(3)</sup> No se realizó el análisis estadístico porque en algunas muestras no se pudo determinar la variable.

*Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola (alfa = 0,05)*

**Cuadro 4.** Propiedades físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola (muestreo 2013). *Se presentan datos promedio por finca (IS, PC y LR) y el promedio entre fincas con los resultados del análisis estadístico.*

Variable <sup>(1)</sup>	IS			PC				LR				Promedio			
	0	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32
Clase textural <sup>(2)</sup>	FL	FL	F-FL	FL	FL	FL-F	F	F	FL-F	FL-F	FA				
Arena (%)	32	32	38	26	27	38	41	44	33	36	55	33,9 ab	30,2 b	35,5 ab	44,7 a
Limo (%)	54	52	45	58	57	53	46	46	51	51	30	52,7 a	53,8 a	51,8 a	40,6 b
Arcilla (%)	14	16	16	16	16	9	13	10	16	14	15	13,4 a	16,0 a	13,0 a	14,8 a
pH	5,9	6,7	6,8	6,8	6,8	7,4	7,0	6,9	6,8	7,3	6,9	6,5 b	6,8 ab	7,1 a	6,9 ab
CE (mmhos cm <sup>-1</sup> )	1,53	0,76	0,35	0,72	0,61	0,92	0,43	1,21	0,79	0,61	0,33	1,16 a	0,70 ab	0,76 ab	0,37 b
CO (%)	2,82	2,34	1,57	2,96	2,44	2,24	1,82	3,91	2,81	2,28	1,46	3,23 a	2,63 ab	2,29 bc	1,62 c
C lábil (mg kg <sup>-1</sup> )	131,9	80,3	51,0	175,0	116,4	104,3	76,0	252,3	174,9	95,7	75,0	186,4 a	145,7 b	93,4 b	67,3 b
N total (%)	0,33	0,22	0,15	0,30	0,22	0,20	0,19	0,42	0,32	0,20	0,13	0,35 a	0,27 ab	0,21 bc	0,16 c
C:N	8,7	10,6	10,5	10,1	10,9	11,3	9,9	9,2	8,9	11,2	11,0	9,3 a	9,9 a	11,0 a	10,4 a
P ext. (mg kg <sup>-1</sup> )	27,6	28,3	7,4	19,4	9,4	4,7	8,1	27,8	25,5	9,1	6,4	24,9 a	17,4 a	14,1 a	7,3 a
C:P	1032	837	2224	1539	15084	13809	2666	1414	1103	3486	2315	1328 a	8093 a	6044 a	2401 a
K (meq kg <sup>-1</sup> )	23,7	29,8	17,6	20,6	21,5	23,8	23,1	15,1	22,9	24,2	17,9	1,98 a	2,22 a	2,59 a	1,95 a
Na (meq kg <sup>-1</sup> )	4,0	4,0	5,0	3,3	4,0	3,3	3,0	4,7	4,0	4,7	5,0	4,0 a	4,0 a	4,0 a	4,3 a

<sup>(1)</sup> CHS: contenido hídrico en saturación; CE: conductividad eléctrica; CO: carbono orgánico total; P ext.: fósforo extractable

<sup>(2)</sup> F: franco, L: limoso, A: arenoso. En el caso de haber sub-sitios con distinta clase textural, se presenta en primer lugar la dominante o se presentan las tres clases presentes. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ )

## 3.2 - Variables microbiológicas: muestreo del año 2011

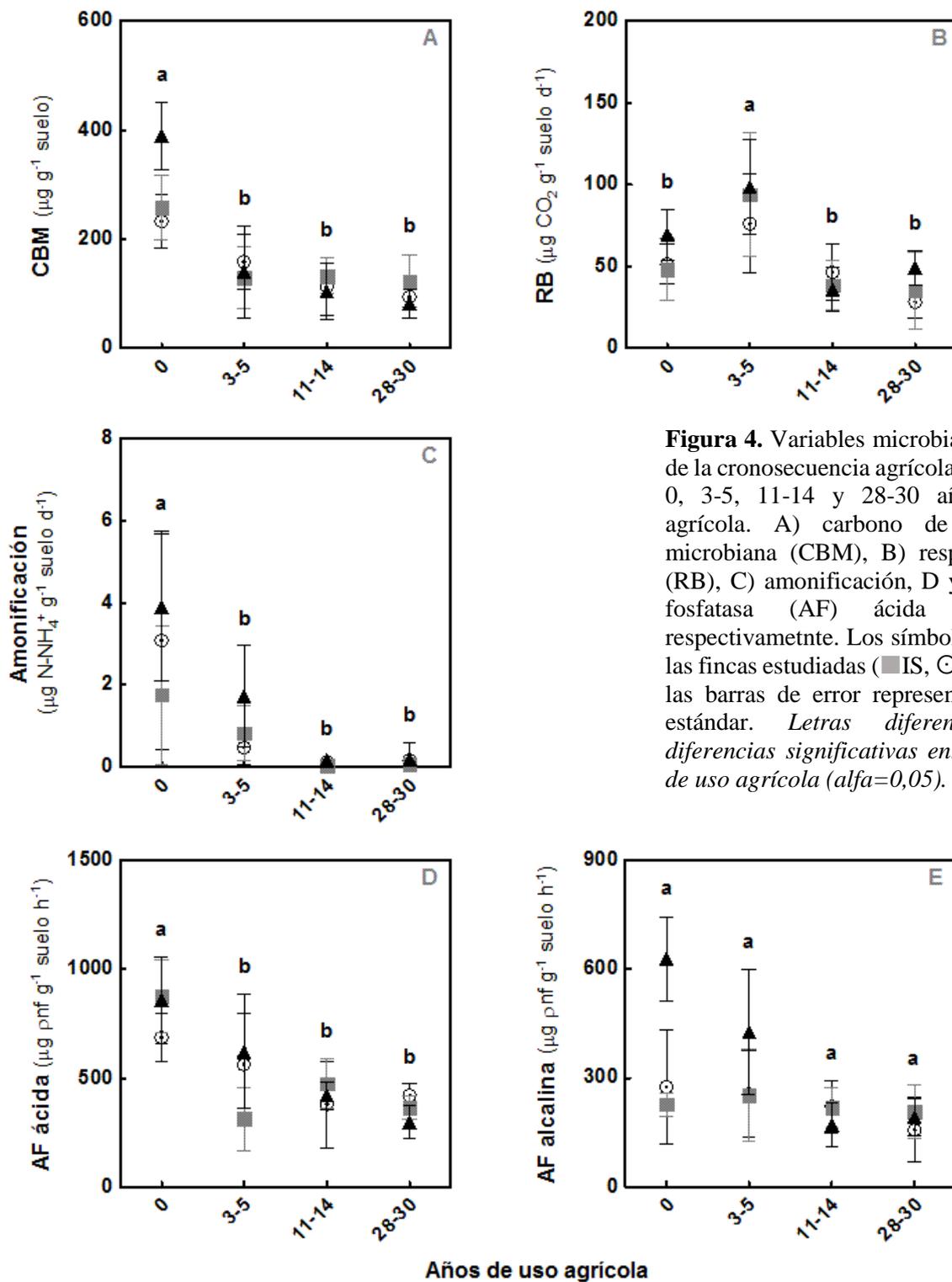
### 3.2.1 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica

En el muestreo del año 2011 se encontró una caída marcada del CBM entre los sitios prístinos y los sitios de 3-5 años de cultivo ( $P < 0,001$ , Figura 4A). Por otra parte, a pesar de que los sitios prístinos de las tres fincas presentaron diferentes niveles de CBM (LR > IS/PC con  $P \leq 0,01$ ), una vez implementado el uso agrícola no hubo diferencias detectables en esta variable. Esta similitud entre sitios agrícolas no sólo se registró entre fincas, sino que también permaneció estable en valores bajos en los distintos estadios de la cronosecuencia. El CBM por unidad de CO se comportó de manera similar, con una caída entre los ambientes prístinos y aquellos con 3-5 años de agricultura, pero tendió a recuperarse, al menos parcialmente, en los últimos estadios (Cuadro 5).

La RB mostró un incremento en los sitios de corta historia agrícola ( $P < 0,001$ ), patrón que fue menos pronunciado en la finca PC (Figura 4B). En contraste, en suelos con 11-14 y 28-30 años de cultivo la RB no difirió de la de suelos prístinos. Por otro lado, estos dos ambientes presentaron valores muy similares tanto entre estadios como entre fincas. En contraposición, el ambiente de corta historia agrícola mostró la variabilidad intra-sitio más alta. La respiración específica o  $qCO_2$  (RB:CBM) presentó una gran variabilidad en todos los sitios cultivados pero, nuevamente, ésta fue particularmente alta en los de corta historia agrícola (Figura 5A). A pesar de ello, también se detectó un incremento en estos sitios con respecto a los sitios prístinos y los de larga historia agrícola ( $P < 0,001$  y  $P = 0,039$ , respectivamente). En las fincas IS y LR, el  $qCO_2$  fue también mayor en el sitio de corta que en el de media historia agrícola ( $P = 0,02$ , análisis complementario). Por último, puede destacarse que los sitios de media y larga historia agrícola presentaron niveles similares de  $qCO_2$  que tendieron a superar a los de sitios prístinos.

De manera similar al CBM, la amonificación de los sitios prístinos fue superior a la de todos los sitios agrícolas, entre los cuales aquellos con media y larga historia agrícola presentaron valores casi indetectables (Figura 4C). Los suelos con mayor amonificación también presentaron mayores niveles iniciales de amonio al momento de la determinación (datos no presentados). La amonificación por unidad de CO o N total se comportó igual que la variable original, siendo mayor en los sitios prístinos que en los cultivados ( $P < 0,003$ ) y sin diferencias entre estos últimos (Cuadro 5). En el caso de la amonificación por unidad de CBM, los suelos prístinos también superaron a los agrícolas, aunque sólo a partir del estadio de 11-14 años de cultivo ( $P = 0,01$  para media y larga historia agrícola) (Cuadro 5).

La AF ácida también respondió con una caída al inicio de la cronosecuencia ( $P < 0,01$  entre prístino y corta historia) para mantenerse en esos niveles luego de sucesivos años de agricultura (Figura 4D). Analizando por separado las tres fincas, se observó que PC y LR mostraron una caída más paulatina, con valores intermedios y gran variabilidad en los sitios de corta historia, mientras que IS mostró una caída marcada ya desde este estadio. El comportamiento de la AF alcalina fue diferente, sin una respuesta clara al uso agrícola (Figura 4E). Sólo la finca LR mostró mayor AF alcalina en el sitio prístino que en los de media y larga historia agrícola, al analizarla por separado ( $P < 0,001$ ). Por otro lado, ambas determinaciones de AF presentaron una menor variabilidad en los sitios con media y larga historia agrícola. Por último, en cuanto a la actividad enzimática específica (por unidad de CO y de CBM), tanto la AF ácida como la alcalina se mostraron invariables ante cambios en el uso de la tierra o historia agrícola (Cuadro 5). A pesar de este resultado, AF alcalina:CBM tendió a aumentar en los sitios de corta historia agrícola con distinta magnitud según la finca.



**Figura 4.** Variables microbianas en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2011: 0, 3-5, 11-14 y 28-30 años bajo uso agrícola. A) carbono de la biomasa microbiana (CBM), B) respiración basal (RB), C) amonificación, D y E) actividad fosfatasa (AF) ácida y alcalina, respectivamente. Los símbolos identifican las fincas estudiadas (■IS, ⊙PC y ▲LR) y las barras de error representan el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

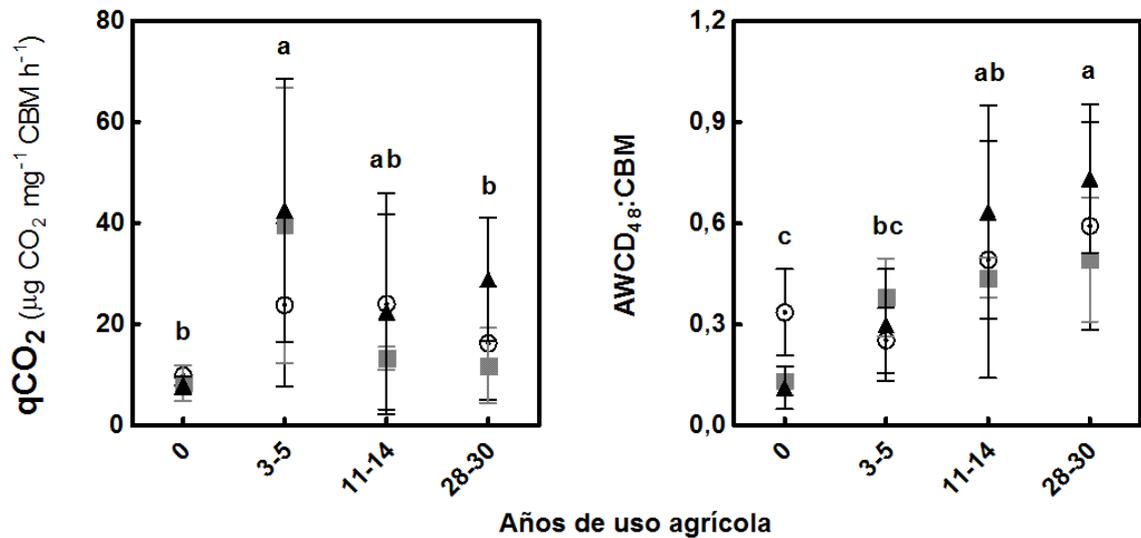
**Cuadro 5.** Cocientes de propiedades microbiológicas y físico-químicas medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2011 (0, 3-5, 11-14 y 28-30 años de uso agrícola). Se presentan valores medios por finca (IS, PC y LR) e incluyendo todas las fincas.

	IS				PC				LR				Promedio			
	0	3-5	11-14	20-28	0	3-5	11-14	20-28	0	3-5	11-14	20-28	0	3-5	11-14	20-28
CBM:CO <sup>1</sup>	1,0	0,6	1,0	0,9	1,1	0,9	0,7	0,7	1,0	0,5	0,9	0,8	1,0a	0,6b	0,8ab	0,8ab
Amonif.:CBM	6,4	7,3	0,0	1,0	13,9	3,1	1,1	1,5	10,5	15,8	1,7	1,6	10,6a	8,7ab	1,1b	1,5b
AF ác.:CO <sup>1</sup>	34,6	14,9	36,6	27,3	33,9	32,5	24,2	33,1	23,4	24,8	35,9	30,5	30,6a	24,1a	32,3a	30,3a
AF ác.:CBM	3,6	2,6	3,8	3,4	3,2	4,1	3,5	5,2	2,4	5,8	5,5	4,4	3,1a	4,2a	4,3a	4,4a
AF alc.:CO <sup>1</sup>	9,0	12,0	16,8	15,6	13,6	14,8	14,1	12,5	17,1	15,6	14,7	19,8	13,3a	14,1a	15,2a	15,9a
AF alc.:CBM	0,9	2,3	1,8	2,2	1,3	1,8	2,3	2,3	1,7	4,2	2,2	2,9	1,3a	2,8a	2,1a	2,5a

CBM:CO: %; Amonificación:CBM:  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \mu\text{g}^{-1} \text{CBM d}^{-1}$ ; AF ácida:CO y AF alcalina:CO:  $\mu\text{g-pnf mg}^{-1} \text{CO h}^{-1}$ ; AF ácida:CBM y AF alcalina:CBM:  $\mu\text{g pnf } \mu\text{g}^{-1} \text{CBM h}^{-1}$ ;

<sup>1</sup> Se presenta un único valor en cada interacción sitio\*finca debido a que solo se cuenta con un dato por sitio de la variable físico-química en cuestión.

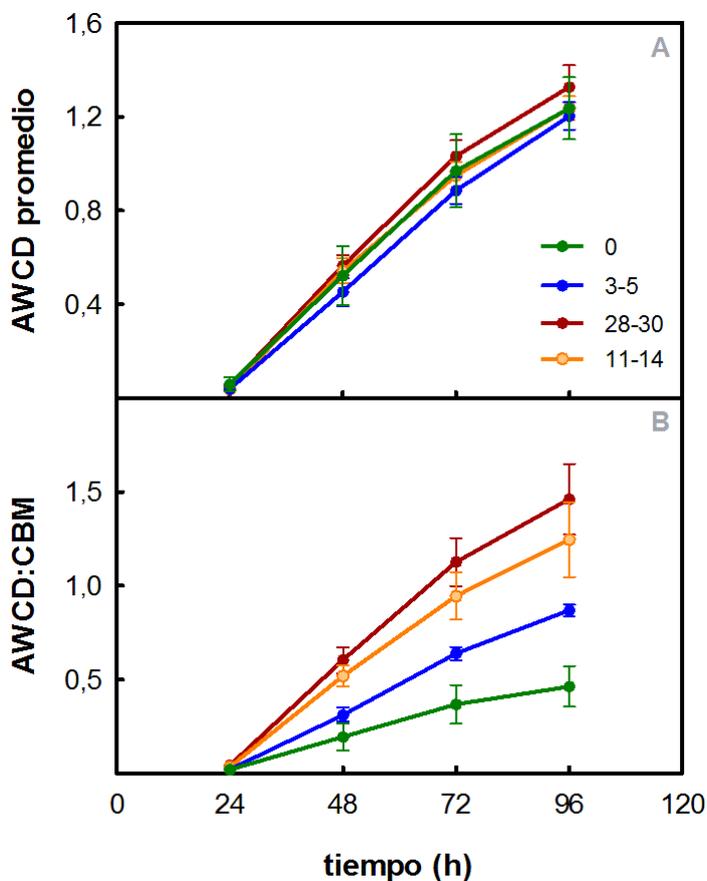
Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ )



**Figura 5.** Cocientes de actividad por unidad de biomasa microbiana en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2011: 0, 3-5, 11-14 y 28-30 años bajo uso agrícola. Se presentan datos de cociente metabólico o  $q\text{CO}_2$  (izq.) y AWCD (*average well colour development*) por unidad de CBM (der.). Los símbolos identifican las fincas estudiadas (■IS, ○PC y ▲LR) y las barras de error representan el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

### 3.2.2 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial

A través de la técnica de CLPP se obtuvieron datos de consumo global de sustratos como AWCD y de perfiles de utilización de los diferentes sustratos carbonados. Para el primer caso, la Figura 6 muestra la evolución del AWCD durante los 7 días de incubación de la microplacas. Tal como sugieren las curvas de las diferentes categorías de uso agrícola, el AWCD no respondió al desmonte ni el tiempo bajo uso agrícola, a la vez que presentó una gran variabilidad intra- e intersitio (Figura 6A). No obstante, al expresar los datos por unidad de CBM se encontró un patrón: a partir de las 48 horas, la relación AWCD:CBM fue mayor en sitios de media y larga historia agrícola que en sitios prístinos, a la vez que estos últimos superaron también a los de corta historia (Figura 6B). Este resultado se observa con mayor claridad en la Figura 5B, que muestra la evolución del AWCD:CBM a lo largo de la cronosecuencia. Allí también se observa que el comportamiento del AWCD:CBM difirió del descripto anteriormente para el  $qCO_2$ .

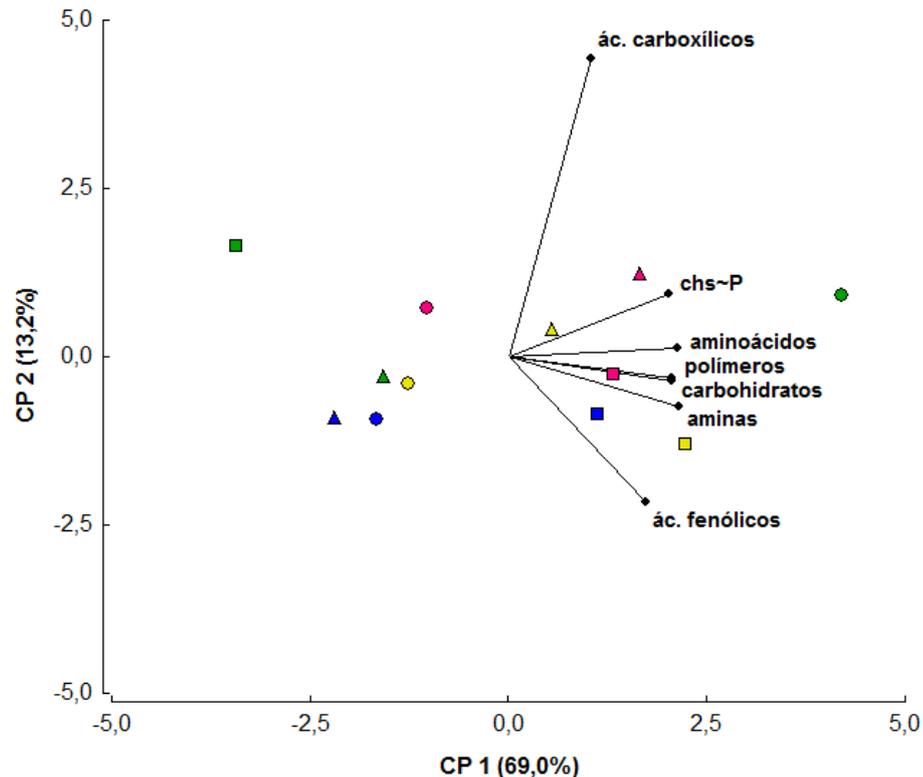


**Figura 6.** Evolución del consumo global de sustratos o AWCD (*average well colour development*) (A) en valores absolutos bruto y (B) por unidad de carbono de la biomasa microbiana o CBM, durante la incubación de suelos del muestreo 2011 en microplacas con distintos sustratos carbonados. Se presentan las curvas para las diferentes categorías de uso agrícola (años de uso) con el valor promedio para cada tiempo. Las barras representan el error estándar ( $n=3$  fincas).

La Figura 7 presenta un biplot de ACP resumiendo la información de los perfiles de utilización de sustratos carbonados, con datos de la lectura de A realizada a las 48 h. Dado que todas las variables tuvieron autovectores positivos para la CP1 (69,0%), mostrando en su mayoría una colinearidad relativamente alta, se podría decir que el ordenamiento en el sentido de la CP1 está dado por el consumo global de sustratos. De cualquier manera, el ordenamiento no determinó ningún agrupamiento de acuerdo al uso de la tierra ni a las distintas fincas. El único patrón que se detectó fue analizando las fincas individualmente: para las fincas IS y PC, los tres sitios agrícolas se agruparon entre sí y lejos del prístino,

en sentidos opuestos a lo largo de la CP1; en cambio, en la finca LR pareció haber una modificación gradual a lo largo de la cronosecuencia, aunque el sentido de los cambios fue el mismo que en la finca IS.

Finalmente, los índices de diversidad calculados a partir del consumo de diferentes sustratos no se modificaron a lo largo de la cronosecuencia, mostrando nuevamente una respuesta poco clara al uso agrícola (datos no presentados).



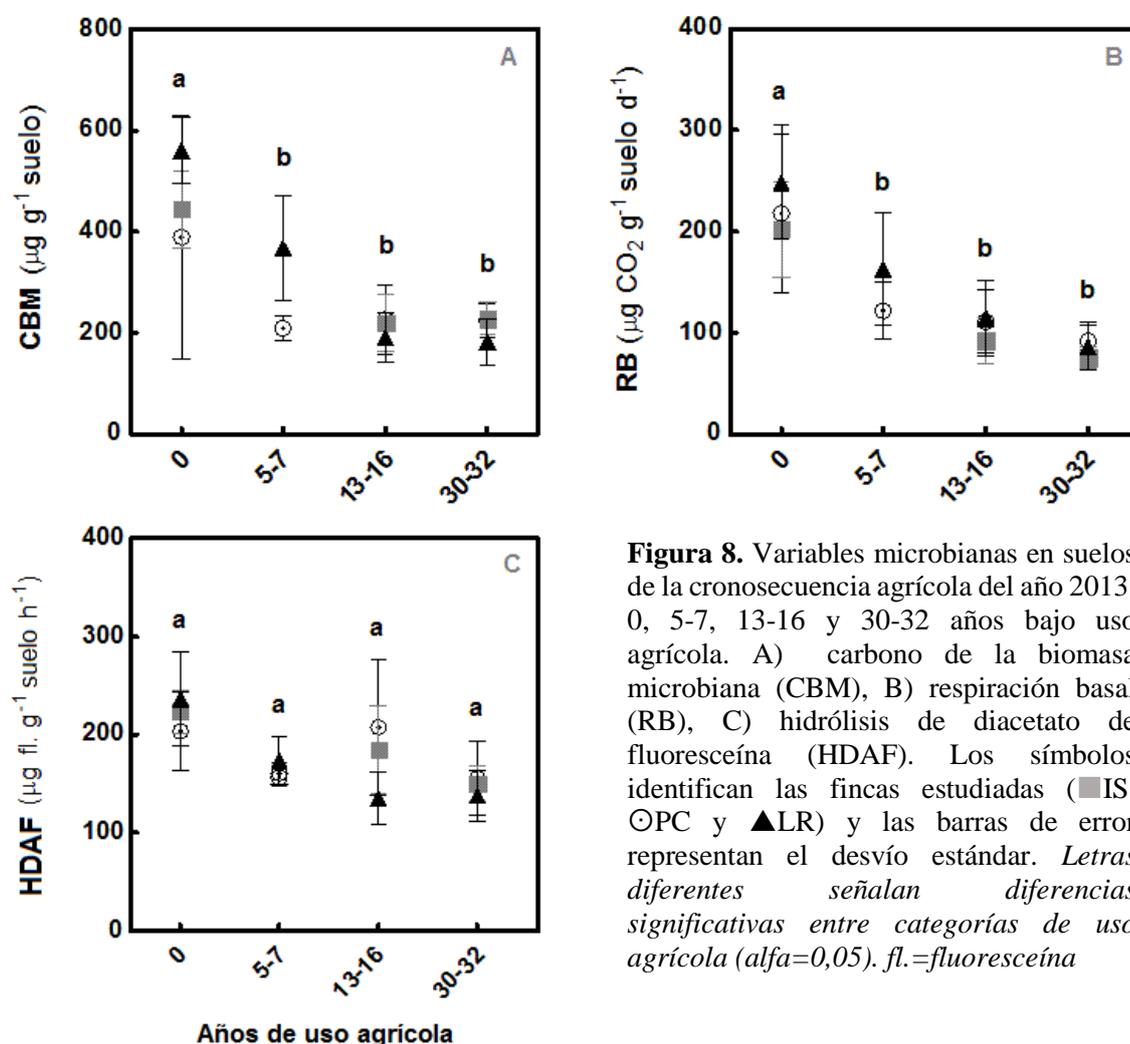
**Figura 7.** ACP de los perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana (CLPP: *Community Level Physiological Profiling*) analizando el consumo de distintos sustratos carbonados, agrupados por estructura química, en suelos de la cronosecuencia del muestreo 2011: 0 (verde), 3-5 (azul), 11-14 (amarillo) y 28-30 (rojo) años bajo uso agrícola. Los símbolos representan las diferentes fincas (■IS, ●PC y ▲LR). *chs~P* = *carbohidratos fosforilados*.

### 3.3 - Variables microbiológicas: muestreo del año 2013

#### 3.3.1 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica

Al analizar los suelos muestreados en 2013 encontramos que se mantuvieron las diferencias en CBM, con mayores valores en suelos prístinos (Figura 8A), mientras que las variables de actividad modificaron su comportamiento en la cronosecuencia (Figuras 8B y 8C). El CBM expresado como porcentaje del CO, sin embargo, sólo difirió entre suelos prístinos y suelos con 13-16 años de cultivo, siendo menor en estos últimos (Cuadro 6). La RB ya no fue superior en los suelos de corta historia agrícola (ahora 5-7 años), sino que se comportó igual que el CBM. Los suelos agrícolas presentaron menor RB que los prístinos, con niveles similares entre sí a pesar de una tendencia a valores intermedios en aquellos de 5-7 años (Figura 8B). A diferencia de la RB, la respiración específica o  $qCO_2$  no presentó diferencias entre ambientes (Figura 9A). En todos los

ambientes el  $q\text{CO}_2$  se mantuvo en valores promedio similares a los registrados en los sitios agrícolas de media y larga historia agrícola del muestreo 2011.



La actividad hidrolítica, esta vez estimada de forma global a través de la HDAF, no difirió entre ambientes (Figura 8C), aunque HDAF:CBM fue mayor en los sitios de media y larga historia agrícola que en el monte (Cuadro 6). Un comportamiento similar se observó para HDAF:CO, aunque las diferencias no fueron con el monte sino con los sitios agrícolas de corta historia (Cuadro 6).

De las variables de actividad inducida por glucosa (SIR y ADH), sólo SIR mostró una respuesta al tiempo bajo uso agrícola (Figura 10), aunque ésta dependió de cómo se expresara la variable en cuestión. La SIR expresada en valores absolutos fue mayor en el suelo prístino, tal como el CBM y la RB (Figura 10A). En cambio, el patrón fue diferente al expresar la SIR como incremento porcentual en la actividad en respuesta al agregado de glucosa (Figura 10B): en este caso, fueron los ambientes de 13-16 y 30-32 años de agricultura los que presentaron mayor incremento, aunque también una gran variabilidad intra-sitio.

La ADH no mostró sensibilidad al uso de la tierra, aunque sí presentó una notable reducción en la variabilidad en los sitios con una historia agrícola mayor a los 13-16 años (Figura 10C). Al analizar SIR y ADH por unidad de biomasa, se encontró que ambas variables prácticamente invirtieron su comportamiento: SIR pasó de ser mayor en el suelo de monte a no presentar diferencias entre ambientes, lo mismo que el  $qCO_2$ , y ADH pasó de no diferir entre suelos a incrementarse con el tiempo bajo uso agrícola, de manera similar a HDAF:CBM (Cuadro 6).

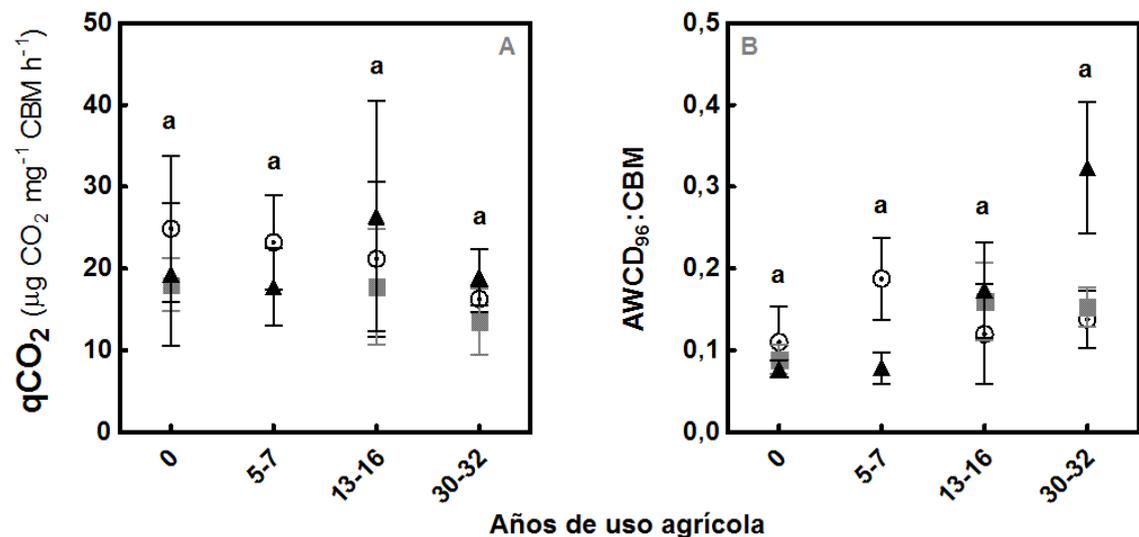
**Cuadro 6.** Cocientes de propiedades microbiológicas y físico-químicas medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola, muestreo 2013 (0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola). Se presentan valores promedio de tres sub-sitios para cada ambiente de cada finca (IS, PC y LR) y el valor medio de las tres fincas.

	IS			PC				LR				Promedio			
	0	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32
CBM:CO	1,74	0,95	1,64	0,95	0,93	0,93	1,36	1,33	1,27	0,75	1,27	1,34a	1,10ab	0,88b	1,43a
HDAF:CO	8,4	7,1	9,3	6,6	6,4	9,6	9,3	6,1	6,5	6,1	9,5	7,0ab	6,4b	7,6ab	9,4a
HDAF:CBM	0,51	0,88	0,67	0,61	0,78	0,98	0,70	0,42	0,51	0,74	0,79	0,52c	0,80bc	0,86a	0,72ab
SIR:CBM	65	99	71	110	108	75	96	56	68	97	86	77a	98a	90a	85a
SIR rta.:CBM	0,03	0,06	0,04	0,06	0,06	0,05	0,06	0,03	0,04	0,07	0,05	0,04a	0,04a	0,06a	0,05a
ADH:CBM <sup>1</sup>	0,03	0,05	0,06	0,04	0,08	0,09	0,08	0,03	0,05	0,10	0,08	0,03b	0,06ab	0,08a	0,07a

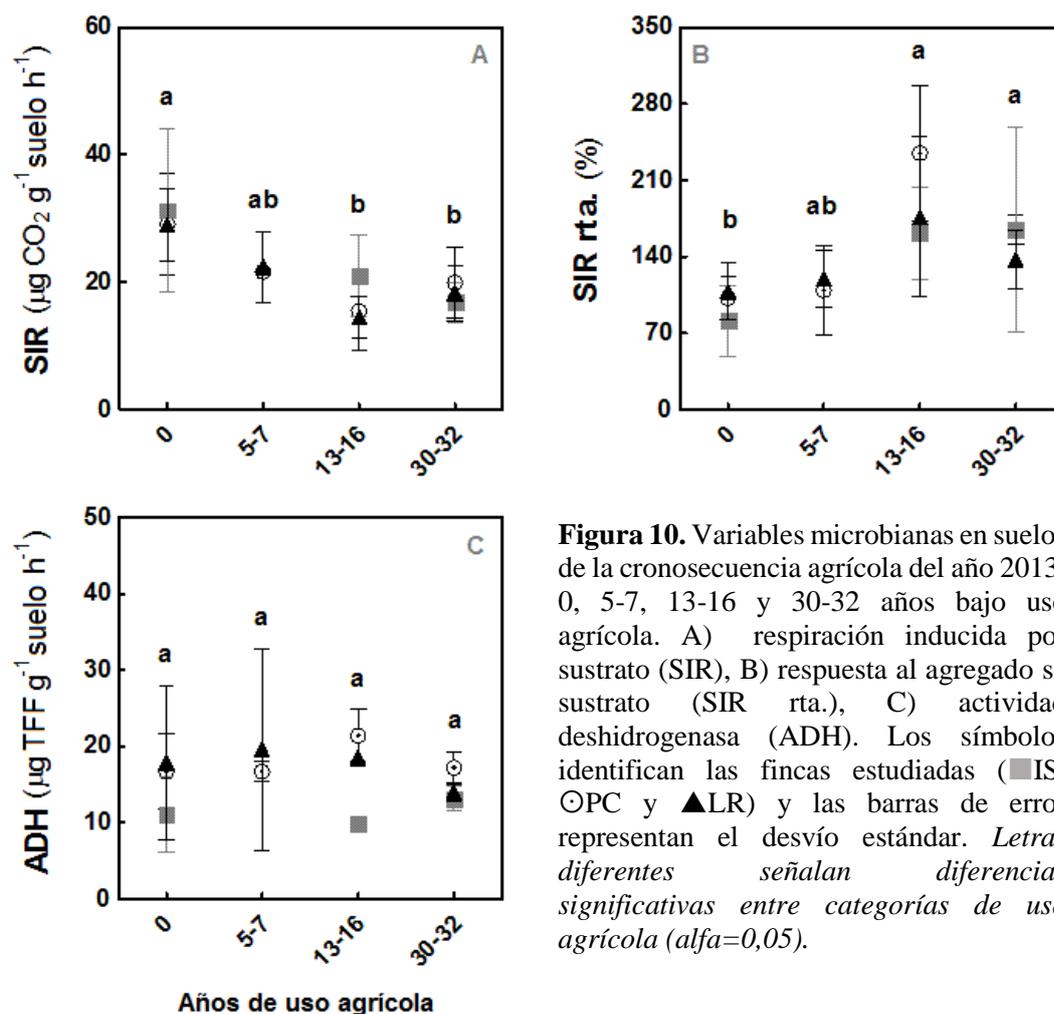
CBM:CO: %; HDAF:CO: mg fluoresceína  $mg^{-1} h^{-1}$ ; HDAF:CBM:  $\mu g$  fluoresceína  $\mu g^{-1} h^{-1}$ ; SIR:CBM:  $\mu g CO_2 mg^{-1} h^{-1}$ ; SIR rta.:CBM:  $mg^{-1} h^{-1}$ ; ADH:CBM:  $\mu g TPF \mu g^{-1} h^{-1}$

<sup>1</sup> El índice se calculó con valores promedio por sitio y no por sub-sitio.

Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ )



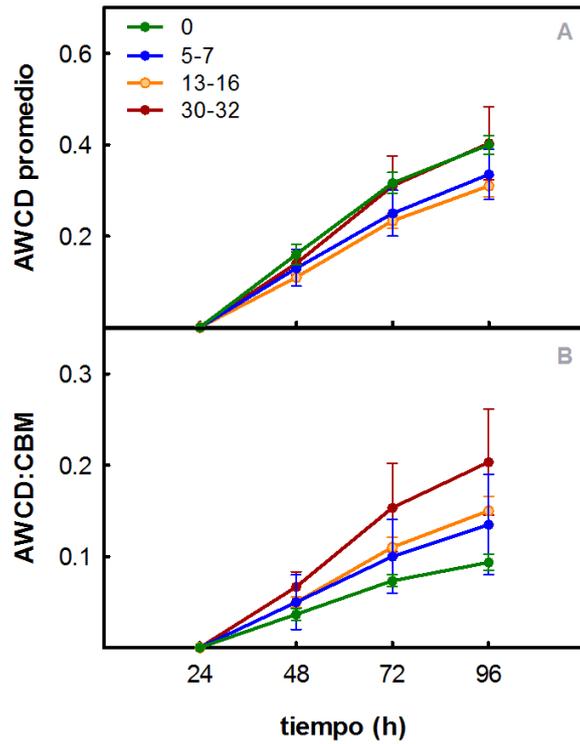
**Figura 9.** Cocientes de actividad por unidad de biomasa microbiana en suelos de la cronosecuencia agrícola del año 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola. Se presentan datos de A) cociente metabólico o  $qCO_2$  (izq.) y *average well colour development* por unidad de CBM (der.). Los símbolos identifican las fincas estudiadas (■IS, ○PC y ▲LR) y las barras de error representan el desvío estándar. Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).



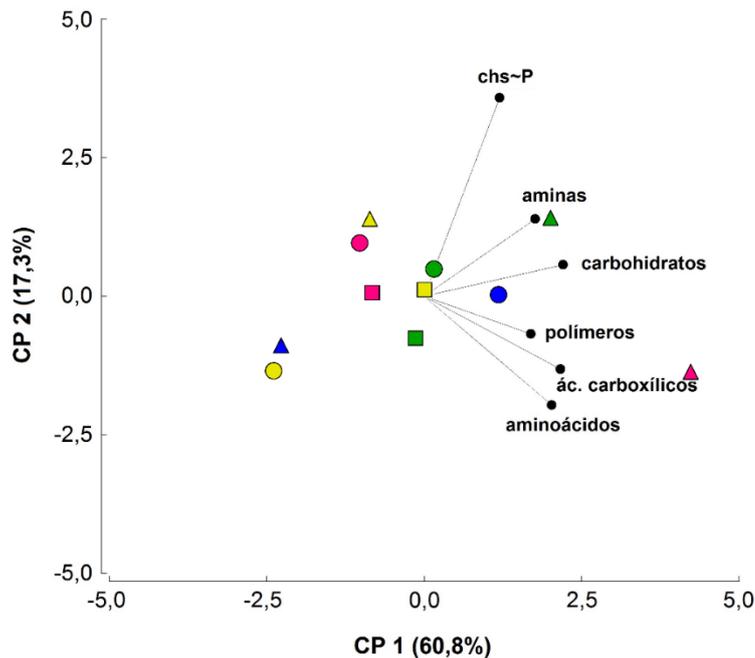
### 3.3.2 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial

El AWCD se evaluó diariamente durante 4 días y, al igual que con los suelos de 2011, en ninguna instancia se detectaron diferencias dadas por el uso agrícola (Figura 11A). Al relativizar el AWCD por la biomasa microbiana y al aumentar el tiempo de incubación los sitios tendieron a diferir por su historia agrícola (Figura 11B). Sin embargo, en la Figura 9B se evidencia que estas diferencias no fueron significativas y que este comportamiento se explicó por una clara tendencia a mayor AWCD<sub>96</sub>:CBM en el sitio larga historia agrícola de una de las fincas.

Con respecto a los perfiles de utilización de sustratos carbonados, la Figura 12 muestra que, salvando el ambiente de larga historia agrícola de la finca LR, hubo una tendencia a la separación entre ambientes prístinos y agrícolas dada por la CP1 (52,8%). La CP1 parece estar explicada por la utilización global de los distintos sustratos, los cuales están correlacionados positivamente. De acuerdo con esta interpretación, la mayoría de los ambientes agrícolas estarían presentando una menor utilización global de sustratos. Todas las categorías de uso agrícola presentaron gran dispersión a lo largo de la CP2 (21,1%), la cual tiene mayor influencia de los sustratos fosforilados y de los aminoácidos.



**Figura 11.** Evolución del consumo global de sustratos o AWCD (*average well colour development*) (A) en valores absolutos bruto y (B) por unidad de carbono de la biomasa microbiana o CBM, durante la incubación de suelos del muestreo 2013 en microplacas con distintos sustratos carbonados. Se presentan las curvas para las diferentes categorías de uso agrícola (años de uso) con el valor promedio para cada tiempo. Las barras representan el error estándar ( $n=3$  fincas).



**Figura 12.** ACP de los perfiles fisiológicos de la comunidad microbiana (CLPP: *Community Level Physiological Profiling*) analizando el consumo de distintos sustratos carbonados, agrupados por estructura química, en suelos de la cronosecuencia del muestreo 2013: 0 (verde), 5-7 (azul), 13-16 (amarillo) y 30-32 (rojo) años bajo uso agrícola. Los símbolos representan las diferentes fincas (■ IS, ● PC y ▲ LR). *chs~P* = *carbohidratos fosforilados*.

Al analizar la diversidad de utilización de sustratos carbonados, encontramos cambios en los índices de Dominancia, Simpson y Shannon en respuesta al uso agrícola (Cuadro 7). El sitio de 13-16 años de cultivo presentó una menor diversidad que el sitio de monte y el sitio con 30-32 años de cultivo, la cual se reflejó a través de un mayor índice de Dominancia y menores valores de los índices de Simpson y Shannon. Los índices de equitatividad calculados (*Evenness* y *Equitability*) no difirieron entre sitios, lo mismo que la riqueza de utilización de sustratos carbonados.

**Cuadro 7.** Índices de diversidad de utilización de sustratos carbonados obtenidos a través de la siembra en microplacas de suelos del muestreo 2013. *Se presentan datos por finca (IS, PC y LR) para las cuatro categorías de la cronosecuencia: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola.*

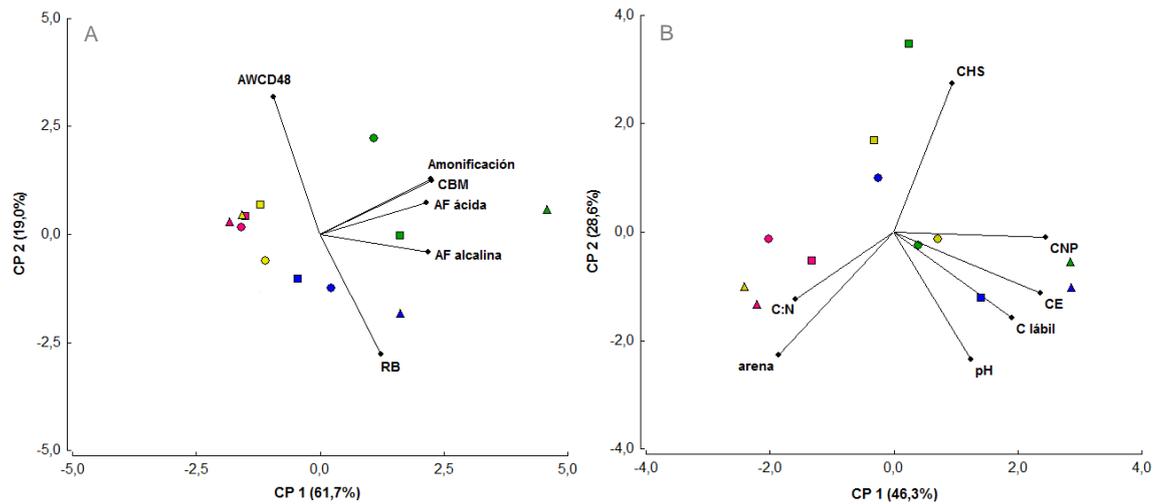
	IS			PC				LR				Promedio			
	0	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32
Riqueza	12,0	9,8	11,4	12,6	12,4	9,0	10,8	13,2	9,8	10,6	14,4	12,6a	11,1a	9,8a	12,2a
Dominancia	0,10	0,13	0,10	0,10	0,10	0,15	0,12	0,09	0,12	0,12	0,08	0,09b	0,11ab	0,13a	0,10b
Shannon	2,39	2,15	2,33	2,42	2,40	2,04	2,25	2,50	2,18	2,23	2,59	2,44a	2,29ab	2,14b	2,39ab
Equitatividad	0,92	0,90	0,91	0,90	0,91	0,91	0,90	0,92	0,90	0,91	0,93	0,92a	0,90a	0,91a	0,91a

*Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola (alfa=0,05)*

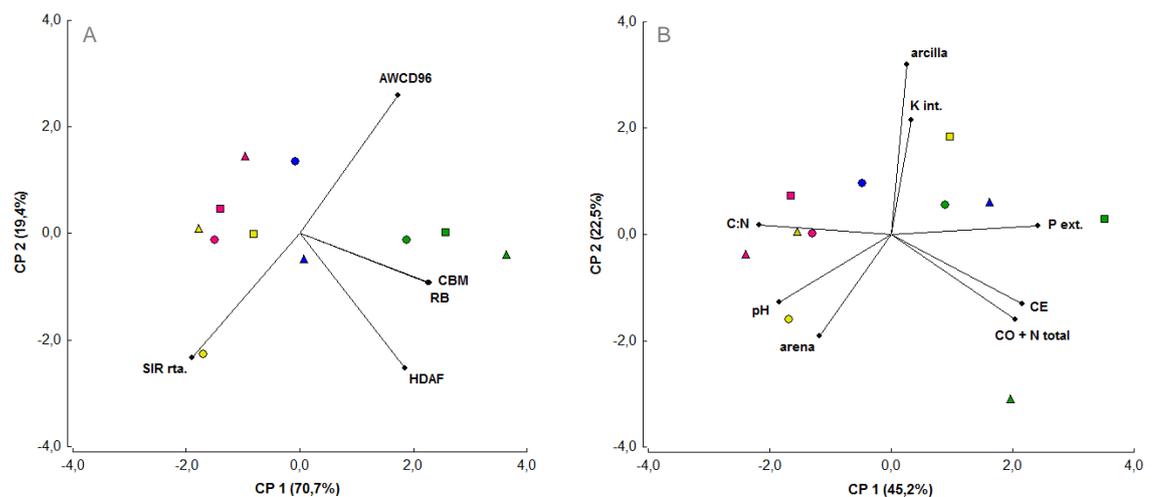
### 3.4 - Relación entre variables microbiológicas y variables físico-químicas del suelo

En 2011, el ACP obtenido a partir de las variables microbiológicas arrojó un claro agrupamiento de los sitios de acuerdo al uso de la tierra (Figura 13A). Los sitios se distribuyeron a lo largo de la CP1 (61,7%) siguiendo el orden de la cronosecuencia, con los sitios de media y larga historia agrícola agrupados entre sí. La CP1 estuvo explicada principalmente por la AF ácida y alcalina, la amonificación y el contenido de CBM, todas variables relativamente colineales y mayores en los suelos prístinos. Por otro lado, la CP2 (19,0%) estuvo afectada por la RB en contraposición con el AWCD<sub>48</sub>, y, por ende, describe tanto la mayor RB en los sitios de corta historia agrícola como la variabilidad de AWCD<sub>48</sub> entre sitios de un mismo ambiente. En contraposición, el ACP de variables físico-químicas exhibió un ordenamiento poco asociado al uso agrícola, salvando el agrupamiento de los sitios de larga historia agrícola (Figura 13B). La CP1, determinada principalmente por el contenido de CNP (CO, N total y P extractable) seguido de CE y C lábil, explicó el 46,3% de la variabilidad total. La CP2 (28,6%), por otra parte, describe diferencias en contenido de arena, retención hídrica y relación C:N.

La homogeneidad de los sitios de larga historia agrícola estuvo dada por su menor contenido de CNP, texturas más gruesas, menor retención hídrica y mayor C:N. En 2013, los ACP para cada set de variables arrojaron un resultado muy similar, con las variables microbiológicas agrupando los sitios por categoría de uso agrícola de manera más definida que las variables físico-químicas (Figuras 14A y 14B). A su vez, puede verse que la CP1 obtenida a partir de variables microbiológicas explicó un mayor porcentaje de la variabilidad total que la CP1 de variables físico-químicas (70,7% vs 45,2%, respectivamente). Ambos análisis resumen la información presentada anteriormente para las variables individuales



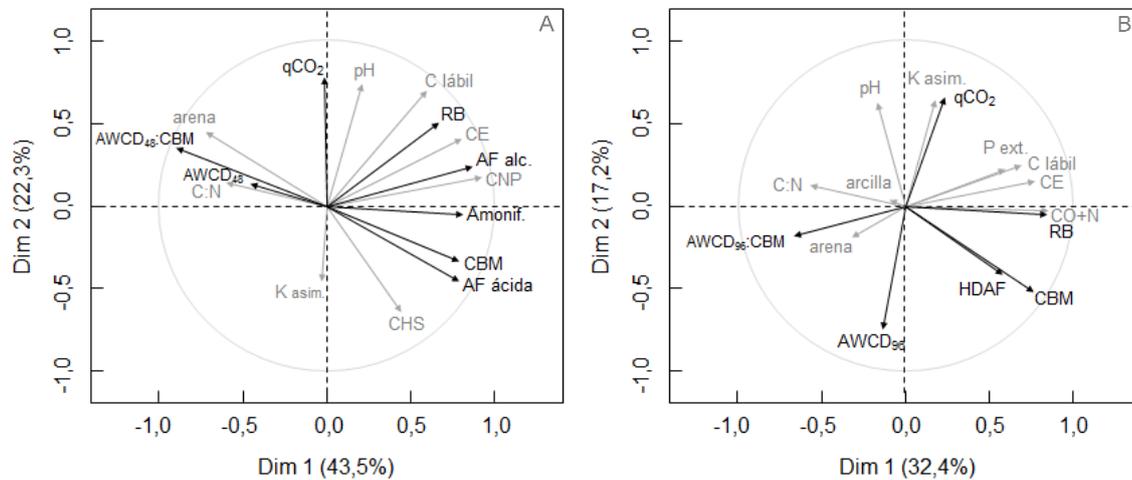
**Figura 13.** ACP de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B) medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola, muestreo 2011. Las formas identifican las fincas (■IS, ●PC y ▲LR) y los colores las categorías de uso agrícola (monte: verde, agrícolas de 3-5 años: azul, 11-14 años: amarillo y 28-30 años: rojo). Los puntos representan centroides para cada sitio en A y mediciones únicas de muestras compuestas en B.



**Figura 14.** ACP de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B) medidas en suelos de la cronosecuencia agrícola, muestreo 2013. Las formas identifican las fincas (■IS, ●PC y ▲LR) y los colores las categorías de uso agrícola (monte: verde, agrícolas de 5-7 años: azul, 13-16 años: amarillo y 30-32 años: rojo). Los puntos representan centroides para cada sitio.

La relación entre ambos sets de variables (microbiológicas y físico-químicas) se analizó en principio a través del análisis de correlación de Pearson (Cuadros S1 y S2). Muchas de las asociaciones encontradas fueron resultado de la covariación en respuesta al cambio en el uso de la tierra. Por ejemplo, todas las variables microbiológicas excepto el AWCD se correlacionaron positivamente con el contenido de CO, N total y P extractable. Se destaca la correlación positiva de la RB, el  $qCO_2$  y la AF alcalina con el contenido de C lábil y, la correlación negativa entre la AF ácida y el contenido de arena. La relación AF ácida:CBM, en cambio, correlacionó positivamente con la relación C:P. Estas relaciones

entre variables se resumen en el círculo de correlación del Análisis Multifactorial (AMF) de la Figura 15A, una representación de las variables individuales de cada set entre ellas y con los ejes del espacio compromiso creado por el análisis.



**Figura 15.** Círculos de correlación del análisis multifactorial integrando variables microbiológicas (negro) y físico-químicas (gris) en cada cronosecuencia: 2011 (A) y 2013 (B). Las flechas señalan el sentido relativo de los cambios y la capacidad explicativa (longitud) de cada variable en el espacio compromiso de ambos sets de datos.

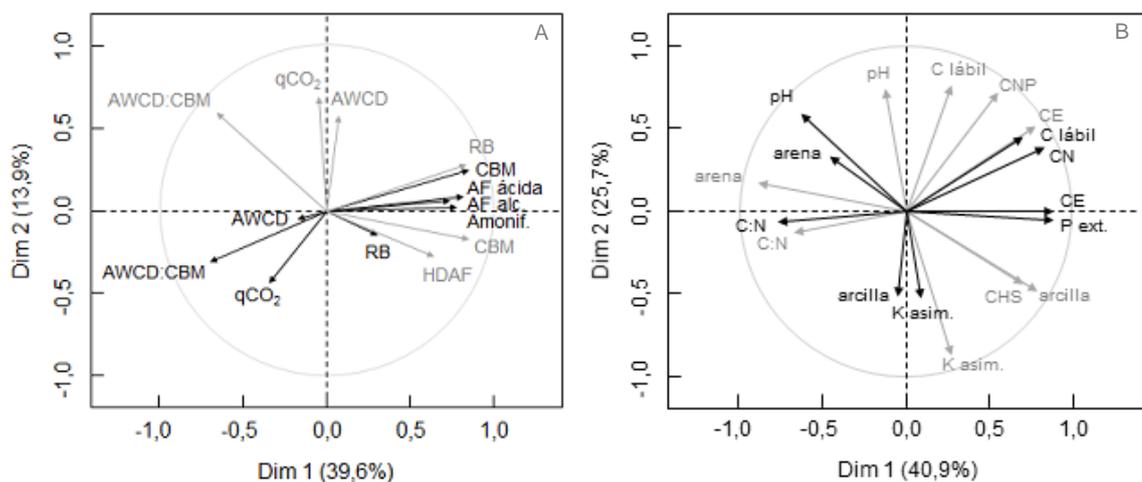
Los coeficientes de correlación de Pearson de 2013 (Cuadro S2) arrojaron resultados similares. Entre las relaciones más esperables, se encontró que tanto el CO como el N total se correlacionaron positivamente con CBM, RB, HDAF y SIR bruta, y negativamente con el cociente AWCD<sub>96</sub>:CBM. El C lábil se comportó de manera similar a estas dos variables, con la excepción de que no mostró relación con SIR sino con ADH. La relación C:N, en cambio, mostró una correlación negativa con CBM, RB y SIR bruta, y positiva, aunque menos marcada, con AWCD<sub>96</sub>:CBM. El contenido de P extractable correlacionó con todas las variables microbiológicas excepto la HDAF; mientras que de los cocientes sólo correlacionó negativamente con AWCD<sub>96</sub>:CBM. Otros resultados interesantes en términos de correlación se observan para pH y CE. Mientras que esta última siguió un patrón similar al de CO y N total, el pH mostró un comportamiento particular. Mayores valores de pH se relacionaron con mayor ADH, SIR-rta. y qCO<sub>2</sub> pero con menor SIR bruta, HDAF y CBM:CO. Por último, al igual que para los suelos de 2011, se presenta el círculo de correlación del AMF (Figura 15B), que resume las relaciones entre variables de ambos sets, microbiológicas y físico-químicas, en el espacio compromiso.

### 3.5 - Análisis de integración entre resultados de ambos muestreos

Las Figuras 16A y 16B corresponden al círculo de correlación entre variables microbiológicas y físico-químicas, respectivamente, de ambos años de muestreo arrojado por un análisis multifactorial o AMF. Al mantener los sets de datos de ambos años por separado, este análisis permitió incluir todas las variables medidas en cada año y asimismo evitar el sesgo dado por el año de muestreo. El AMF permitió ver varias

similitudes entre años de muestreo (*i.e.*, variables en gris y variables en negro) tanto en términos microbiológicos como físico-químicos.

Las variables más afectadas por los años de cultivo fueron el CBM y la actividad hidrolítica, con la diferencia de que esta última fue menos sensible en el muestreo de 2013. La RB y el  $qCO_2$  fueron las variables que más se modificaron entre muestreos, con mayores niveles en 2013 y un patrón de respuesta diferente. En 2013 ya no se registró un incremento de estas variables en los sitios de corta historia, sino que la RB se redujo con el tiempo y el  $qCO_2$  fue muy variable y no presentó diferencias entre ambientes. El AWCD presentó escasa respuesta al uso agrícola en ambos años, pero los valores registrados en 2013 fueron menores a los de 2011 aun cuando se tomó la determinación de 96 h y no la de 48 h, probablemente debido a que la técnica utilizando microplacas BIOLOG® registra mayores valores de absorbancia. Por último, el AWCD:CBM en 2013 perdió el patrón temporal creciente hallado en 2011, aunque sí se mantuvo para una de las fincas.



**Figura 16.** Círculos de correlación del análisis multifactorial integrando ambas cronosecuencias (negro: 2011 y gris: 2013) en términos de variables microbiológicas (A) y físico-químicas (B). Las flechas señalan el sentido relativo de los cambios y la capacidad explicativa (longitud) de cada variable en el espacio comprometido de ambos sets de datos.

## 4 - Discusión

Debido a que cada muestreo constituye en sí un escenario en particular, esta discusión comenzará con los resultados del primer muestreo y luego, relacionándolos con éste, se discutirán los resultados del segundo muestreo.

### 4.1 - Propiedades físico-químicas del suelo

Las variables físico-químicas respondieron de manera muy similar al cambio en el uso agrícola en ambos años, a pesar de la menor potencia del análisis realizado en 2011 con muestras compuestas. Esta similitud tiene sentido si se tiene en cuenta que las propiedades físico-químicas de los suelos son menos sensibles a los cambios y por ende se mantienen estables por más tiempo. Los suelos con larga historia agrícola (28-30/30-32 años de cultivo) estuvieron caracterizados por menor capacidad de retención hídrica y menor contenido de CO, N total y P extractable, tal como hallaron otros autores en escenarios

análogos (Lemenih *et al.*, 2005; Moebius-Clune *et al.*, 2011; Bahr *et al.*, 2014). Algunas variables se comportaron diferente en ambos muestreos, lo cual que podría adjudicarse a la distinta profundidad de muestreo (0-15 cm en 2011 y 0-10 cm en 2013) y/o a la propia heterogeneidad del suelo. En 2011, por ejemplo, los suelos de larga historia agrícola también presentaron texturas más gruesas, mientras que esto no llegó a detectarse en 2013.

A través de los ACP, se observó que las propiedades físico-químicas estuvieron menos asociadas al uso agrícola que las microbiológicas, lo cual denota la mayor sensibilidad de estas últimas ante una alteración del sistema edáfico. En relación con esto, no todos los cambios observados en términos microbiológicos pudieron asociarse a cambios en las variables físico-químicas medidas, sino que fue evidente la complejidad que subyace a cada variable microbiana medida, algo ciertamente difícil de desentrañar a través de coeficientes de correlación e incluso métodos estadísticos más complejos. Tal como lo exponen Spohn y Chodak (2015), en gradientes ambientales marcados como esta cronosecuencia, donde muchas variables covarían, es difícil sacar conclusiones respecto de relaciones causa-efecto. Si la intención es revelar interacciones entre propiedades físico-químicas y una variable microbiana en particular, probablemente sean más interesantes estudios de carácter más intensivo, como un muestreo refinado a pequeña escala, donde se reduce a un mínimo la influencia de otros factores. En un estudio como éste, las variables físico-químicas tiene un valor más que nada complementario, al facilitar el conocimiento del medio abiótico del cual surge cada dato microbiológico y, por ende, enriquecer su interpretación.

## 4.2 - Biomasa microbiana, respiración y actividad hidrolítica

### *Biomasa microbiana*

El CBM es uno de los estimadores de biomasa microbiana más frecuentemente utilizados para comparar distintos suelos en términos de su “abundancia” de microorganismos y evaluar su sensibilidad ante distintos factores naturales o antrópicos (Kaschuk *et al.*, 2010). En el muestreo de 2011 encontramos claras pérdidas de biomasa microbiana en respuesta al cambio en el uso de la tierra, las cuales se atribuyen a los disturbios impuestos por el desmonte y las prácticas agrícolas. Se sabe que la biomasa microbiana podría aumentar durante los primeros meses posteriores a la deforestación, en respuesta a un incremento en la disponibilidad de carbono y nutrientes (Feigl *et al.*, 2008). Sin embargo, éste parece ser un efecto a muy corto plazo ya que, en la mayoría de los estudios de desmonte para agricultura extensiva, donde las determinaciones se realizan al cabo de más de un año, los niveles de biomasa microbiana eventualmente se reducen a niveles menores que los del suelo prístino (*e.g.*: Bossio *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008; Kaschuk *et al.*, 2010; Brackin *et al.*, 2013; Pérez-Brandán *et al.*, 2014). No obstante, también se han registrado casos donde el cambio en el uso de la tierra no derivó en pérdidas de biomasa microbiana; por ejemplo, en varios estudios de conversión de bosque prístino a pastura no se encontró dicho detrimento (Sparling *et al.*, 1994; Frazão *et al.*, 2010) e incluso se han llegado a observar un aumentos (Islam y Weil, 2000; Tischer *et al.*, 2015).

En base a los resultados obtenidos, se podría decir que una vez acontecido el desmonte e implementada la agricultura, los niveles de CBM cayeron a niveles similares,  $\sim 77-126 \mu\text{g C g}^{-1}$  suelo, sin importar las diferencias en biomasa microbiana entre los sitios de pedemonte de las diferentes fincas. Esa caída en biomasa podría ser aún más pronunciada si se tiene en cuenta que los ambientes prístinos aquí estudiados (“cortinas de monte”)

podrían estar influenciados por los sitios agrícolas colindantes, tal como se encontró en análisis con otros sitios de la zona (Vogrig y Tosi, datos no publicados). Por otro lado, esos valores se mantuvieron en los sucesivos años bajo cultivo sugiriendo que se trata de un valor umbral de CBM para los suelos agrícolas de esta zona y bajo las condiciones impuestas por el manejo agrícola (*i.e.*, menor cantidad y mayor estacionalidad de *inputs* de carbono y nutrientes, junto con continuo disturbio impuesto por las prácticas agrícolas). Dicho valor umbral podría estar asociado a mecanismos abióticos del suelo, como ser la protección física del carbono lábil y microbiano (Six *et al.*, 2002), o podría ser el resultado de una estrategia de las comunidades microbianas para tolerar condiciones estresantes. Las prácticas de manejo también podrían tener influencia, puesto que esos suelos se manejan bajo labranza convencional en los primeros dos años, luego de los cuales se implementa la siembra directa. En este sentido, un meta-análisis de Kaschuk *et al.* (2010) concluyó que la siembra directa reduce el disturbio sobre el suelo a niveles que, o bien protegen el CBM remanente, o bien promueven su acumulación, dependiendo de las condiciones. Sea cual sea el mecanismo subyacente, en nuestro estudio los niveles de CBM del suelo parecieran mantenerse estables al menos desde los 3 hasta los 30 años de cultivo. Estudios similares en Sudáfrica y Grecia también encontraron una estabilización de la biomasa microbiana, pero el valor umbral no fue alcanzado hasta luego de 20-25 años de cultivo (Dominy *et al.*, 2002; Eleftheriadis y Turrión, 2014). Esta diferencia marcada con nuestro estudio podría estar explicada tanto por diferencias en las propiedades del suelo y el manejo agrícola como por el clima. En un clima subtropical como el de Anta, los veranos con altas temperaturas y precipitaciones podrían acelerar aún más los procesos promovidos por el disturbio, en particular las tasas de mineralización y, por ende, las pérdidas de CBM y otras fracciones del carbono orgánico.

El CO total también se redujo con el cambio en el uso de la tierra, tal como reportaron otros autores (Islam y Weil, 2000; Murty *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Eleftheriadis y Turrión, 2014), aunque su caída se hizo evidente más tarde que la del CBM. El CBM es una variable más sensible que el CO y, por ende, se considera que predice cambios en su dinámica y en los flujos de carbono (Insam y Domsch, 1988; Henrot y Robertson, 1994; Sharma *et al.*, 2004; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Kaschuk *et al.*, 2010). En este caso, el CBM y el CBM:CO parecieran predecir las pérdidas en CO observadas en los sitios de 11-14 años de agricultura. Siguiendo con lo discutido para CBM, la presión impuesta por las prácticas agrícolas, con suficiente tiempo, podría llevar a la pérdida de fracciones más estables del carbono del suelo, aunque la revisión bibliográfica de Six *et al.* (2002) sugiere que esto dependerá del manejo que reciba el suelo y que incluso suelos con manejo intensivo podrían presentar mayor CO que su contraparte prístina. En términos generales, sin embargo, cuando el desmonte es sucedido por pasturas en lugar de cultivos, el impacto sobre el CO del suelo parece ser menor (Murty *et al.*, 2002; Don *et al.*, 2011). De hecho, otro estudio realizado en Yungas, donde se evaluó el efecto del desmonte para la implementación de pasturas sobre la materia orgánica del suelo, registró caídas de CO menores a las encontradas en este trabajo (Ripley *et al.*, 2010).

Un factor a tener en cuenta es que en este estudio los datos de CBM y CO se calcularon por unidad de masa de suelo, ya que no se contaba con el dato de densidad aparente para expresarlos también por unidad de volumen. Esto último es preferible en situaciones donde se espera que exista una densificación del perfil, ya que, de otro modo, al tomar muestras a profundidad constante, podría estar subestimándose el contenido de CBM o CO de los suelos densificados para ese estrato por un efecto de "dilución" (Murty *et al.*, 2002). Estos autores reportaron que las diferencias entre suelos prístinos y agrícolas se

mantuvieron, aunque fueron menos pronunciadas al expresarlas por unidad de volumen. Si se tiene en cuenta que los suelos aquí analizados pasaron por un proceso de densificación con los años de cultivo (Rodolfo Gil, INTA Castelar, comunicación personal), también podríamos estar incurriendo en una subestimación de los datos, en especial en los ambientes agrícolas de larga historia de uso.

### ***Respiración basal y cociente metabólico***

La actividad microbiana global fue estimada a partir de la RB, que representa la actividad heterotrófica en condiciones basales (de campo) de sustrato, pero en condiciones óptimas de temperatura y humedad (Alef, 1995a), con lo cual es también un indicador del flujo potencial de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Esta variable se comportó de manera diferente a lo reportado en la bibliografía. Mientras que en estudios similares a éste la RB fue superior en suelos de monte que en suelos agrícolas (Anderson y Domsch, 1990; Islam y Weil, 2000; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008; Eleftheriadis y Turrión, 2014), aquí se observó un incremento en los sitios con 3-5 años de cultivo. Por lo descripto para CBM, este incremento no puede ser explicado por una mayor biomasa microbiana, que fue inferior en estos suelos. Esta relación entre RB y CBM determinó que esos suelos presentaran también una mayor respiración específica o qCO<sub>2</sub>. El qCO<sub>2</sub> expresa la respiración basal por unidad de biomasa y es considerado un indicador de la eficiencia metabólica o, en términos ecológicos, el grado de madurez o nivel de estrés del ecosistema del suelo (Anderson y Domsch, 1990; Anderson, 2003; Bastida *et al.*, 2008). Algunos trabajos hallaron mayor respiración específica en suelos cultivados o pastoriles que en suelos prístinos, sin distinción de edad agrícola (*e.g.*, Ross *et al.*, 1999; Montecchia *et al.*, 2011). En bosques tropicales de Bangladesh, 12 años después del desmonte, los suelos cultivados presentaron un mayor qCO<sub>2</sub> que los suelos prístinos (Islam y Weil, 2000). Otro estudio, situado en la selva amazónica, registró mayor qCO<sub>2</sub> en pasturas de 1-2 años que suelos prístinos y pasturas de mayor antigüedad, dinámica que los autores atribuyeron a un desequilibrio y re-estabilización de las comunidades microbianas (Melo *et al.*, 2012).

El qCO<sub>2</sub> podría aumentar en respuesta a un desequilibrio en las comunidades microbianas del suelo dado por el disturbio que implican el desmonte y las prácticas agrícolas (Anderson, 2003; Anderson y Domsch, 2010). A su vez, ese desequilibrio podría estar relacionado con una dominancia de microorganismos copiotróficos o estrategias *r* en relación con los oligotróficos o estrategias *K* (Montecchia *et al.*, 2011). Esta clasificación es considerada una simplificación, pero es útil para interpretar el metabolismo predominante a grandes rasgos: en comparación con los microorganismos oligotróficos, los copiotróficos consumen preferentemente fuentes lábiles de C, tienen altos requerimientos nutricionales y pueden alcanzar altas tasas de crecimiento ante una alta disponibilidad de sustrato (Fierer *et al.*, 2007a). A favor de esta hipótesis, en un trabajo realizado con algunos de los suelos de esta cronosecuencia, se encontró que los suelos de corta historia agrícola estuvieron caracterizados por dos OTUs (*operational taxonomic units* o unidades taxonómicas operativas) de *Betaproteobacteria*, una clase del *phylum Proteobacteria* que abarca varios taxones copiotróficos (Montecchia *et al.*, 2015). Éste parece ser un claro ejemplo de relación entre estructura y función, donde la respuesta funcional parece estar explicada, al menos en parte, por la estructura de la comunidad bacteriana. Una explicación adicional para esta mayor abundancia de copiotróficos es la disponibilidad de C lábil (Leirós *et al.*, 2000; Dinesh *et al.*, 2003), que en este caso se condice con la liberación de carbono lábil que desencadena la deforestación (Feigl *et al.*, 2008). La mayor disponibilidad de C lábil en los sitios de 3-5 años se corroboró a través de las determinaciones de carbono extractable con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que a su vez fue mayor en los

sub-sitios con mayor  $qCO_2$ , reflejando una relación clara con la variabilidad intrasitio observada para esta variable. En línea con esta última explicación, Spohn y Chodak (2015) encontraron que el  $qCO_2$  aumentó con la relación C:N o C:P, por mecanismos de equilibrio entre la estequiometría del suelo y de la microbiota, aunque este fenómeno pareciera observarse en una escala mucho menor a la analizada en este estudio, ya que aquí no se encontró relación positiva entre esas variables. De cualquier modo, éste no es un dato menor, ya que implicaría que una menor disponibilidad de nutrientes podría acelerar la mineralización y afectar el secuestro de carbono en el suelo (Kirkby *et al.*, 2014; Spohn y Chodak, 2015).

Independientemente del motivo que induce tal desequilibrio en la comunidad, la presencia de una comunidad microbiana con menor eficiencia en la utilización del carbono podría derivar en pérdidas de CO, algo que se corroboró con la caída de CO en el estadio agrícola posterior, de 11-14 años de cultivo. Ante el surgimiento de técnicas más específicas como los isótopos estables, donde pueden conocerse los flujos de un sustrato marcado incorporado en el suelo, el  $qCO_2$  parece una herramienta menos informativa. Sin embargo, a pesar de no conocerse el origen exacto del CO<sub>2</sub> emitido, una ventaja clave del  $qCO_2$  es que refleja una situación más cercana a la real, ya que no está limitado a un único sustrato y las comunidades microbianas no son alteradas por la introducción de un compuesto (Falchini *et al.*, 2003; Eilers *et al.*, 2010; Spohn y Chodak, 2015). Interpretando los resultados con prudencia, este cociente permite caracterizar el estado metabólico de la comunidad metabólica a través de dos determinaciones sencillas (Anderson y Domsch, 2010).

### ***Actividad hidrolítica***

Las variables funcionales relacionadas con la mineralización de nutrientes, amonificación y actividad fosfatasa, siguieron una dinámica similar a la de la biomasa microbiana. Los suelos prístinos presentaron mayores tasas de amonificación que los suelos cultivados, aunque con gran variabilidad intra-sitio. Por otro lado, los datos registrados en suelos cultivados fueron llamativamente bajos, en algunos casos nulos, lo cual no refleja una situación realista, sino que está asociado a limitaciones del método: la incubación en anaerobiosis posiblemente haya restringido la amonificación a pesar de la alta temperatura de incubación, al ser ésta una actividad principalmente intracelular y al estar excluyendo a los microorganismos aeróbicos (Alef, 1995b).

Resultados similares a los nuestros fueron encontrados en el sur de Brasil, con una mayor amonificación en suelos forestales que en suelos cultivados (Nogueira *et al.*, 2006). En México, Campos *et al.* (2014) también hallaron esas diferencias entre suelos cultivados y suelos prístinos de dos estratos altitudinales (bosque tropical nuboso y bosque tropical deciduo), pero no en el estrato superior de bosque de coníferas. No se encontraron antecedentes publicados sobre la evolución de la amonificación en una cronosecuencia agrícola, pero sí de la mineralización total del N (producción de amonio y nitrato) en una cronosecuencia de selva amazónica y pasturas de diferente edad (Piccolo *et al.*, 1994; Neill *et al.*, 1995). De modo similar a lo observado en este trabajo, esos estudios hallaron una reducción en la mineralización de N en respuesta al cambio en el uso de la tierra. En un caso, al igual que en este trabajo, no encontraron efecto del tiempo bajo uso pastoril (Piccolo *et al.*, 1994), pero en otro encontraron un efecto negativo de esta variable (Neill *et al.*, 1995), aunque los autores argumentan que podría haber efectos confundidos debidos a la inmovilización y los *inputs* de carbono elevados de las pasturas. La evolución de la amonificación potencial en esta cronosecuencia estuvo asociada al CBM, pero aún al relativizar la actividad a la biomasa de cada ambiente la actividad fue superior en el

monte, con lo cual no pareciera ser consecuencia únicamente de la mayor biomasa microbiana del monte. Lo mismo se observó al relativizar por el contenido de CO (datos no presentados), contrario a lo encontrado por Neill *et al.* (1997). Esto último contribuye a pensar que las diferencias entre suelos de monte y suelos agrícolas están reguladas por factores distintos del contenido de materia orgánica o la abundancia de microorganismos, como podría ser la composición de las distintas comunidades microbianas y su potencial para llevar a cabo esta función.

La técnica de incubación anaeróbica restringe la amonificación pero también inhibe la nitrificación, y es por ello que se la considera estimadora de la mineralización potencial de N, variable con la cual mostró buena correlación (Kandeler, 1996). Según este autor, la actividad proteasa también se ve limitada por la anaerobiosis, pero, lo mismo que la amonificación, es en parte compensada por una mayor temperatura. También debe tenerse en cuenta que el dato obtenido es de mineralización neta, aunque, tal como explica Kandeler (1996), en esas condiciones la inmovilización es subestimada porque también ocurre a menores tasas. Este dato también puede relacionarse con una menor actividad intracelular, ya que la liberación de amonio es resultado de distintos tipos de reacción, las cuales son, exceptuando la hidrólisis de urea, exclusivamente intracelulares (Alef, 1995b). Esto tiene sentido con la relación positiva hallada entre amonificación y CBM.

Los suelos con 11-14 y 28-30 años de cultivo arrojaron niveles casi indetectables de amonificación. Una posible explicación son las condiciones de incubación, en anaerobiosis, que podrían ser más restrictivas en suelos con una comunidad microbiana de menor capacidad funcional. Contrario a lo encontrado, hay quienes atribuyen a los suelos bajo cultivo un mayor potencial de mineralización de N orgánico en respuesta al disturbio de las labores agrícolas (Shi *et al.*, 2010). Sin embargo, ésta es una predicción para una condición *in situ*, que no necesariamente estará reflejada por la actividad potencial *in vitro* de las comunidades microbianas de esos suelos. Por otro lado, la inmovilización, que en este caso está siendo subestimada por la anaerobiosis, podría tener una contribución importante y reducir así la mineralización neta de suelos forestales. Se podría argüir también que la disponibilidad de sustrato (N orgánico) está limitando ese potencial en los suelos agrícolas. Sin embargo, un ensayo de prueba evidenció lo contrario, ya que al determinar la amonificación incorporando L-arginina como sustrato, el suelo prístino siguió superando al agrícola y esa diferencia fue incluso más marcada que en el control sin L-arginina (datos no presentados).

Pese a que se esperaría que la metodología de incubación en anaerobiosis sea más repetible, por inhibir la oxidación del amonio, nosotros encontramos considerable variabilidad en las mediciones, incluso dentro de un mismo sub-sitio. Esto puede deberse a que, además de la inmovilización, que de por sí es restringida, podrían estar interviniendo otras transformaciones menos frecuentes, pero igualmente factibles. DNRA (*dissimilatory nitrate reduction to ammonium*) o anammox (*anaerobic ammonium oxidation*) podrían llevar a sobreestimar o subestimar, respectivamente, los niveles de amonio provenientes de la mineralización (Robertson y Groffman, 2015). De hecho, DNRA resultó ser una reacción común y relevante en suelos de bosques tropicales y anammox fue reportada en suelos periódica o permanentemente sumergidos (Robertson y Groffman, 2015). En este tipo de determinaciones, conocidas como “de caja negra”, las mayores limitantes son precisamente el no poder identificar los procesos subyacentes que derivan en un determinado producto (en especial cuando no se trata de un sustrato artificial) ni controlar las fuentes de variabilidad que surgen de ellos. Por esta razón en el muestreo siguiente se decidió trabajar con la hidrólisis de fluoresceína, que, a pesar de englobar muchas reacciones en una, es un estimador relativamente robusto de actividad

hidrolítica potencial, principalmente porque trabaja con un único sustrato artificial y se restringe al seguimiento de su transformación.

Las fosfomonoesterasas, comúnmente conocidas como fosfatasa, son enzimas intra- y extracelulares que catalizan la hidrólisis del P orgánico a fosfatos, con lo cual su actividad estima parte de la mineralización potencial de fósforo orgánico en el suelo. Si bien estas enzimas no participan en la hidrólisis de compuestos de gran abundancia como los fosfolípidos o los ácidos nucleicos, donde actúan las fosfodiesterasas, se supone que ambos grupos de enzimas reaccionan en cadena (Nannipieri *et al.*, 2011). En este estudio sólo la AF ácida fue sensible al cambio en el uso de la tierra, al igual que se encontró en suelos tropicales de Kenia y del Caribe (Bossio *et al.*, 2005; Acosta-Martínez *et al.*, 2007) y en suelos de la región (Tosi *et al.*, 2010). Renz *et al.* (1999) hallaron un resultado similar en la sabana brasileña, con un detrimento en respuesta al uso agrícola pero, a su vez, un interesante efecto positivo de la implementación de pasturas. A pesar de que la caída pareció ser gradual en dos fincas, el análisis no detectó esa dinámica, sino que reportó que los niveles de AF ácida de suelos de 3-5 años se asemejaron a los de suelos con 28-30 años de cultivo. Dado que la AF ácida no difirió entre suelos agrícolas de diferente antigüedad y manejo, se podría decir que el desmonte reduce de manera permanente la actividad de una enzima relevante en la mineralización del fósforo, pudiendo restringir la disponibilidad de fósforo para la vegetación.

El hecho de que la AF ácida por unidad de CO y CBM no haya variado a lo largo de la cronosecuencia, de manera similar a lo hallado por Bossio *et al.* (2005), sugiere una fuerte dependencia entre estas variables. Este antecedente coincide con el de Renz *et al.* (1999), que encontraron que la AF ácida se relacionó más con el CO del suelo y la actividad microbiana que con la disponibilidad de P inorgánico o el pH. Sin embargo, no es posible discernir cuál es el mecanismo principal determinando esta relación. Por un lado, una mayor actividad enzimática por unidad de biomasa microbiana podría deberse a una mayor síntesis de enzimas, liberación de enzimas inmovilizadas en la matriz del suelo o mayor disponibilidad de sustrato para la reacción (Bastida *et al.*, 2008; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008a). Con respecto a esto último, la AF ácida:CBM correlacionó positivamente con C:P, con lo cual una menor disponibilidad de fósforo en el suelo estaría estimulando la actividad de las enzimas hidrolíticas por unidad de biomasa, de manera similar a lo reportado por Tischer *et al.* (2014a) en una secuencia de deforestación-pastura-recuperación en los Andes ecuatorianos. Sin embargo, junto con la acción de la biomasa microbiana operan otros mecanismos que regulan la actividad enzimática. La relación entre AF y CO podría estar asociada a los mecanismos de adsorción y estabilización de las enzimas extracelulares en los complejos organominerales del suelo (Deng y Tabatabai, 1997; Nannipieri *et al.*, 2011). Este fenómeno podría amortiguar el efecto negativo de cualquier práctica sobre la capacidad hidrolítica del suelo, haciéndola menos sensible que la biomasa total o la activa (*e.g.*, Paz-Ferreiro *et al.*, 2010; Tischer *et al.*, 2014a). Hay autores que incluso plantean la ocurrencia de un enriquecimiento en enzimas hidrolíticas en suelos agrícolas, al punto de que podría llegar a determinarse una mayor relación AF:CO (Bossio *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008a).

La AF alcalina pareció ser menos sensible al uso agrícola y esto coincide con lo informado por Monreal y Bergstrom (2000) en respuesta al cambio en el uso de la tierra y por An *et al.* (2008) en una cronosecuencia agrícola. No obstante, otros estudios registraron una respuesta sensible de la AF alcalina al desmonte para la agricultura (Salam *et al.*, 1998; Bossio *et al.*, 2005; Gil-Sotres *et al.*, 2005). En este trabajo, la falta de correlación entre ambas AF no pudo ser explicada por diferencias en pH entre los suelos ni tampoco al diferente origen de ambas fosfatasa; aunque las fosfatasa ácidas tengan un origen mixto

(microbiano y vegetal) y las fosfatasas alcalinas sean sintetizadas únicamente por microorganismos (Deng y Tabatabai, 1997), se considera que la contribución de las raíces es muy baja (Nannipieri *et al.*, 2011). Un factor adicional pudo haber sido que al medir la AF ácida, con buffer pH 6,5, se incluye también la actividad de algunas fosfatasas alcalinas (Nannipieri *et al.*, 2011). Por otro lado, en la finca LR sí hubo una respuesta sensible de la AF alcalina al uso agrícola, con una caída gradual entre el monte y los primeros años de cultivo (según análisis complementario). Esta finca también fue la que presentó mayores niveles (y, por ende, mayor caída) de CO y CBM, con lo cual es probable que nuevamente la AF esté asociada a estas dos variables. Al margen de este caso particular, nuestros resultados sugieren que hay otros factores regulando la abundancia y/o actividad de las fosfatasas alcalinas del suelo, como los ya descritos mecanismos de adsorción a los coloides del suelo. Se encontró, por ejemplo, una relación positiva entre la AF alcalina y el C lábil, que podría indicar que la mayor disponibilidad de sustrato carbonado indujo la actividad hidrolítica para la obtención de fósforo. Según el estudio de Tischer *et al.* (2015), las propiedades físico-químicas del suelo tienen una influencia clave en la regulación de la actividad de las distintas enzimas extracelulares, que en muchos casos parece desacoplar su respuesta al cambio en el uso de la tierra.

### 4.3 - Perfiles fisiológicos y diversidad funcional potencial

Al analizar los datos de utilización global de sustratos carbonados en microplacas se encontró que el AWCD no se modificó a lo largo de la cronosecuencia, contrario al resultado de Gomez *et al.* (2000) en suelos de Entre Ríos, donde esta variable fue menor en los suelos con mayor tiempo de uso agrícola. Sin embargo, surgió un patrón interesante al expresar esta variable por unidad de biomasa. La relación AWCD:CBM fue mayor en suelos con larga historia agrícola que en suelos de monte, a pesar de que se esperaba que siguiera el comportamiento del  $qCO_2$  y fuera superior en los suelos con 3-5 años de cultivo, que parecían presentar mayor proporción de microorganismos copiotróficos. Esta discrepancia podría deberse a las restricciones propias de la técnica utilizada, ya que los valores de AWCD corresponden a una fracción limitada de la comunidad microbiana, que son las bacterias heterotróficas de rápido crecimiento desarrollándose a partir de una única fuente de carbono (Garland, 1999; Nannipieri *et al.*, 2003). Por ende, los datos de  $qCO_2$  y AWCD:CBM no son necesariamente comparables, ya que en esta última no sólo se restringe la fracción analizada sino que también quedan excluidos factores edáficos, como el contenido de carbono lábil, que podrían determinar el nivel de actividad microbiana.

El análisis multivariado de los CLPP no arrojó ningún ordenamiento asociado a los estadios de la cronosecuencia ni al uso de la tierra. Resultados similares se encontraron en otros trabajos (Waldrop *et al.*, 2000; Bissett *et al.*, 2013), aunque también hay reportes que evidencian una marcada relación entre los CLPP y el uso de la tierra (Gomez *et al.*, 2000, 2004). Tampoco encontramos diferencias en los índices de diversidad ni en el consumo relativo de diferentes tipos de sustrato, en contraste con antecedentes que reportan una mayor diversidad de utilización de sustratos y/o una mayor respuesta a sustratos complejos en suelos forestales que en suelos cultivados (Gomez *et al.*, 2000, 2004; Bossio *et al.*, 2005; Brackin *et al.*, 2013; Pérez-Brandán *et al.*, 2014). Los perfiles encontrados tampoco se asociaron al cultivo presente al momento del muestreo ni a su estado fenológico. Según Bissett *et al.* (2013), una respuesta homogénea de los CLPP en diferentes suelos podría explicarse por una alta heterogeneidad intrínseca en la microescala, la cual resultaría en una mayor capacidad metabólica en una escala más amplia como la del sitio. La alta variabilidad intra-sitio detectada en este caso sustenta

esa hipótesis. Esta variabilidad probablemente esté vinculada a su gran sensibilidad, algo que se destaca en el estudio de Chaer *et al.* (2009b), donde el nivel de disturbio físico impuesto en un corto período (3 meses) repercutió marcadamente sobre los CLPP, siendo más sensible que perfiles estructurales de ADN bacteriano (T-RFLP) y de fosfolípidos (PLFA).

#### 4.4 - Aporte y discrepancias del muestreo de 2013

Los resultados obtenidos en el muestreo del año 2013 reforzaron algunos de los patrones encontrados, pero también mostraron discrepancias que derivaron en nuevas interrogantes. El déficit hídrico en el muestreo de 2013 llevó a tener dos diferencias adicionales entre ambos muestreos, además del tiempo bajo cultivo transcurrido: el contenido hídrico de las muestras y la profundidad de muestreo. Lo más probable es que la menor profundidad de muestreo haya tenido repercusión principalmente en términos absolutos, afectando los valores promedio de cada variable. Por ejemplo, la profundidad podría explicar la mayor biomasa microbiana y respiración basal por gramo de suelo en suelos de 2013 en comparación con los de 2011, ya que tanto la biomasa como actividad microbiana aumentan hacia la superficie. De ser así, el factor profundidad estaría compensando posibles mermas causadas por el déficit hídrico, aunque deben tenerse en cuenta otros factores que pueden haber reforzado este resultado. Con respecto al CBM, la biomasa medida es total, con lo cual las formas de reposo y las células muertas pero intactas están incluidas. Por otro lado, los mayores valores de CBM del muestreo 2013 podría estar explicado también por un sesgo de la metodología de fumigación-extracción, ya que el contenido citoplasmático de carbono suele aumentar ante un déficit hídrico (Schimel *et al.*, 1989). En cuanto a la RB, cobra especial importancia el efecto del estrés hídrico: la RB se mide al 60% CC de humedad, con lo cual la comunidad microbiana no sólo se recupera del déficit hídrico, sino que consume la biomasa de microorganismos muertos (crecimiento críptico). Este crecimiento críptico, a su vez, tiene relación con la biomasa microbiana presente en la muestra y, de este modo, pudo haber exacerbado el patrón de la RB, que en 2013 fue mayor en los ambientes prístinos. Este patrón, no obstante, también puede estar explicado por el C lábil, que en ambos años presentó una correlación positiva con RB. En 2011 el C lábil fue superior en los sitios de corta historia agrícola, mientras que en 2013 fue el monte el que presentó mayor concentración de C lábil por gramo de suelo.

El CBM fue nuevamente superior en los ambientes prístinos y similar entre suelos agrícolas, reforzando las hipótesis de que el cambio en el uso de la tierra impacta negativamente sobre esta variable y que ésta se estabiliza en ciertos niveles a pesar de los sucesivos años bajo uso agrícola. Una discrepancia con el muestreo de 2011 fue que las diferencias suelos prístinos y agrícolas fueron menos marcadas, en especial para los de 5-7 años de cultivo, algo que no se esperaría que tenga relación con la mayor edad de los sitios agrícolas. Una posible causa es la profundidad de muestreo, si es que la distribución en profundidad varía entre sitios y son los sitios agrícolas los que presentan mayor concentración hacia la superficie. Otra es el estrés hídrico, que, al estar imprimiendo un efecto negativo sobre todos los suelos, estaría en cierta forma homogeneizando las características de sus comunidades microbianas. El efecto del déficit hídrico pareciera reflejarse también en el  $qCO_2$ , que, con gran variabilidad intra-sitio, abarcó un rango de valores muy similar a lo largo de la cronosecuencia. El hecho de que el  $qCO_2$  se haya comportado de este modo y haya presentado valores superiores a los registrados en 2011 admite, cuanto menos, dos explicaciones posibles. Una de ellas es que se esté reflejando el estado metabólico de una comunidad microbiana que fue sometida a una condición

estresante por un largo período de tiempo (*i.e.*, mayor  $qCO_2$  sería consecuencia de una comunidad predominantemente copiotrófica con menor eficiencia en la utilización del C). La otra explicación posible, en parte asociada a ésta, es que el crecimiento críptico haya elevado la RB a niveles lo suficientemente altos como para modificar el  $qCO_2$ ; en este caso, la similitud entre ambientes estaría explicada por el hecho de que tanto el crecimiento críptico (afectando el numerador del  $qCO_2$  a través de RB) como la biomasa microbiana (denominador del  $qCO_2$ ) están asociados positivamente entre sí. Al igual que para la RB, el C lábil presentó una correlación positiva con el  $qCO_2$ , a pesar de haber sido superior en los suelos de monte.

En el muestreo 2013 se decidió incorporar al estudio SIR y ADH como dos variables de actividad inducida por un sustrato fácilmente utilizable, la glucosa, para indagar con mayor profundidad en la actividad microbiana. Aunque la SIR se correlacionó positivamente con el CBM y la RB, siendo superior en el monte, al expresarla como respuesta (incremento relativo a la actividad basal) esta relación se invirtió y fue superior en los ambientes con una historia agrícola relativamente larga, en especial por el aporte de algunos sub-sitios con elevada respuesta. Este comportamiento es similar a lo hallado para el AWCD (actividad global en respuesta a sustratos agregados) por unidad de CBM en 2011, aunque no se observó lo mismo para AWCD:CBM en 2013. Dichas diferencias podrían deberse a la selección y el menor número de sustratos utilizados de las microplacas utilizadas en 2013, así como al hecho de que las placas comerciales BIOLOG® suelen arrojar mayores valores de  $A_{590}$ . De hecho, aunque la SIR rta.:CBM sólo tuvo una tendencia a incrementarse, ADH:CBM también fue superior en ambientes de larga historia agrícola, sosteniendo la idea de que estos suelos responden más rápidamente a los sustratos lábiles disponibles.

En línea con lo encontrado para utilización de sustratos, en este muestreo el resultado de CLPP fue equivalente al anterior, con ausencia de patrón por uso agrícola o finca. A pesar ello, y la menor cantidad de sustratos utilizada para el ensayo, en las muestras de 2013 se encontraron algunas diferencias a nivel de diversidad funcional potencial. Los sitios de 13-16 años se caracterizaron por CMS menos diversas en la utilización de sustratos carbonados, con dominancia de algunos sustratos sobre otros. De cualquier manera, esto no coincide con los antecedentes previamente citados, donde la mayor diversidad funcional había sido hallada en suelos prístinos (Gomez *et al.*, 2000, 2004; Bossio *et al.*, 2005; Brackin *et al.*, 2013; Pérez-Brandán *et al.*, 2014). No se encontró una relación directa entre la menor diversidad funcional de los sitios de 13-16 años de cultivo y las propiedades físico-químicas de suelo. Tampoco se pudo relacionar este resultado, ni los CLPP, con el cultivo en pie al momento del muestreo, que en este caso sólo difirió para el sitio de 30 años de la finca PC, con maíz en lugar de soja cosechada.

La actividad hidrolítica global medida por HDAF no mostró una respuesta marcada al uso agrícola como la AF ácida y la amonificación medidas en 2011, a pesar de que en muestras de ese año la correlación entre estas variables fue positiva. En el NE de Brasil, da Silva *et al.* (2012) tampoco encontraron diferencias en HDAF entre un suelo cultivado con caña y un suelo forestal, aunque otros autores informaron menores niveles de esta actividad en suelos cultivados que en suelos prístinos (Chaer *et al.*, 2009a; Nunes *et al.*, 2012). En este caso lo único que se observó fue una tendencia a menor HDAF con el tiempo bajo uso agrícola, pero, por los resultados obtenidos en los suelos del muestreo 2011, se esperaba una respuesta más sensible de esta variable. De acuerdo con lo explicado para el caso de la AF, es probable que esté ocurriendo un proceso de compensación dado por el hecho de que la determinación abarca la actividad de enzimas intracelulares y varias enzimas extracelulares. Corroborando en parte esta hipótesis,

HDAF:CO fue superior en los suelos con mayor historia agrícola, lo cual evidencia un enriquecimiento en enzimas como el observado por otros autores (Bossio *et al.*, 2005; Trasar-Cepeda *et al.*, 2008a). La HDAF por unidad de CBM siguió una dinámica análoga, de manera que el enriquecimiento en enzimas estaría compensando la pérdida de biomasa en estos ambientes, manteniendo una capacidad hidrolítica relativamente similar a la del monte. Por último, probablemente exista un efecto de las características propias del muestreo: la menor profundidad podría estar acentuando el efecto compensatorio de las enzimas extracelulares (mayor contenido de materia orgánica), mientras que el déficit hídrico podría estar reduciendo las diferencias entre tratamientos al imprimir un efecto negativo sobre las CMS de todos los ambientes.

#### 4.5 - Síntesis de los resultados obtenidos

Este enfoque en cronosecuencia permitió inquirir en la dinámica de las comunidades microbianas del suelo una vez acontecido el desmonte. El muestreo en fincas fortaleció los patrones encontrados para la mayoría de las variables, permitiendo extrapolar algunos de los resultados a otros suelos de la zona bajo el mismo manejo. En muchos aspectos, las comunidades microbianas de suelos de corta, media y larga historia agrícola se asemejan y sugieren así que los cambios radicales ocurren al inicio de la cronosecuencia, de lo cual se deduce que el mayor impacto sobre estas variables lo produce el cambio en el uso de la tierra y las modificaciones que éste induce en el ecosistema edáfico. Además del evidente perjuicio de la pérdida de biomasa microbiana, los resultados evidencian una menor capacidad hidrolítica, y todas estas variables impactan directamente sobre el ciclado de carbono y nutrientes. Los resultados de este capítulo concuerdan con lo hallado por nuestro grupo en términos de perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas, donde aquellas pertenecientes a un suelo recientemente desmontado se comportaron de modo más similar a las de un sitio con 20 años de cultivo que a las del pedemonte aledaño (Montecchia *et al.*, 2011). Un resultado similar en términos de la composición de genes funcionales fue reportado por Paula *et al.* (2014) en suelos de la selva amazónica convertidos a pasturas.

Adicionalmente, estos cambios drásticos al inicio también implicaron un incremento en la respiración potencial y, posiblemente, una menor eficiencia en la utilización del carbono. Esto estuvo acompañado de una mayor variabilidad en éstas y otras de las variables medidas, probablemente como resultado de una mayor heterogeneidad espacial resultado del proceso de desmonte. A pesar de estas particularidades de los sitios de 3-5 años de agricultura, y de las diferencias en los sitios prístinos, en los años subsiguientes se reveló un claro proceso de estabilización (valores umbrales de biomasa y aspectos funcionales), a través de las similitudes entre sitios de media y corta historia agrícola, y de homogeneización, con una variabilidad intra- e intersitio reducida. Esto se reforzó con los resultados de 2013 y más aún si se tiene que cuenta que algunos de esos sitios agrícolas de media y larga historia presentaron diferente cultivo (o estado fenológico) al momento del muestreo, aunque de por sí se esperaría que su efecto no sea tan marcado al haberse realizado un estudio en suelo no rizosférico. Reforzando nuestro resultado, algo similar se encontró al estudiar las comunidades bacterianas de esos suelos por pirosecuenciación del gen 16S rRNA, a través de una reducción de la diversidad beta en suelos con larga historia agrícola (Montecchia *et al.*, 2015).

Las discrepancias encontradas en el segundo muestreo sugieren una fuerte impronta de las condiciones ambientales al momento del muestreo, a la vez que abren interrogantes respecto de cuáles fueron los factores más influyentes, principalmente sobre la RB y el qCO<sub>2</sub>. El déficit hídrico, la profundidad de muestreo y el tiempo adicional bajo uso

agrícola son todos factores que podrían generar diferencias tanto en los niveles absolutos de las variables medidas como en la relación entre categorías de uso agrícola. En cualquier caso, estos resultados remarcan la importancia de realizar seguimientos en el tiempo para conseguir una caracterización más robusta de las comunidades microbianas de esos suelos.

## 5 - Conclusiones

Este estudio en cronosecuencia con un diseño en fincas permitió inferir sobre la dinámica temporal de las comunidades microbianas desde el suelo prístino hasta luego de 30 años de cultivo. Los resultados sugieren que los cambios más drásticos están dados por el cambio en el uso de la tierra más que por el tiempo bajo cultivo. Al inicio de la cronosecuencia los suelos mostraron una reducción en biomasa microbiana, que pareció caer a un nivel umbral para todos los suelos agrícolas, y en mineralización potencial de nutrientes. Asimismo, en los primeros años las comunidades microbianas registraron una menor eficiencia en términos de utilización del carbono, que pareció reflejarse años más tarde en pérdidas de CO. Hacia el final de la cronosecuencia, se observó una aparente estabilización y homogeneización de las variables medidas, excepto en términos de respuesta a la adición de sustratos carbonados, donde parecieron predominar microorganismos capaces de degradar rápidamente los sustratos disponibles. La realización de dos muestreos advirtió sobre la variabilidad impuesta por las condiciones al momento del muestreo y cómo pueden condicionar la interpretación de los datos. A pesar de que las limitantes en el muestreo no permitieron desentrañar los factores determinantes de las diferencias entre 2011 y 2013 (déficit hídrico, tiempo transcurrido o profundidad de muestreo), el déficit hídrico prolongado del segundo muestreo probablemente haya inducido modificaciones en la estructura y en las funciones llevadas a cabo por las comunidades microbianas de esos suelos, pudiendo afectar las relaciones entre ambientes, como ocurrió en el caso de la respiración basal y el cociente metabólico. Por último, se concluye que las variables físico-químicas fueron en general menos sensibles que las microbiológicas, tal como se había planteado, y que la relación entre estas variables y las microbiológicas es útil sólo a modo orientativo, ya que existen covariaciones que no permiten desentrañar el verdadero origen de las relaciones encontradas entre ambos sets de variables. Si el objetivo es indagar en la relación entre CMS y variables físico-químicas, deben realizarse estudios a menor escala, reduciendo al mínimo los factores involucrados.

### **CAPÍTULO 3**

**ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA VIABLE A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLÍPIDOS EN SUELOS DE UNA CRONOSECUENCIA AGRÍCOLA DEL NOA**



## 1 - Introducción

### 1.1 - Antecedentes y presentación del problema

La metodología conocida como PLFA, de las siglas en inglés *phospholipid fatty acids* (ácidos grasos de los fosfolípidos), surgió como herramienta para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas del suelo en la década del '90 (Tunlid y White, 1992; Frostegård *et al.*, 1993a; b). Su principal ventaja residía en poder estudiar la estructura de los microorganismos del suelo sin recurrir al cultivo y aislamiento, con lo cual se accedía a ese gran porcentaje de la comunidad (95-99%) que hasta entonces era prácticamente desconocido por no ser cultivable. Otra ventaja, a diferencia de técnicas asociadas a ácidos nucleicos, es que los fosfolípidos se asocian a las células viables y no se encuentran en células muertas ni en productos de reserva (Zelles, 1999; Drenovsky *et al.*, 2004). Esto se debe a que son lípidos polares de la membrana plasmática que, una vez liberados al medio por muerte celular, son rápidamente transformados en diglicéridos lipídicos neutros por acción de fosfolipasas intra- y extracelulares (Hedrick *et al.*, 2007).

El análisis de PLFA realizado con más frecuencia abarca la mayoría de los microorganismos presentes en la comunidad, salvando las arqueobacterias, que, a diferencia de la mayoría de los organismos, presentan fosfolípidos de membrana característicos, con función éter y no éster (Zelles *et al.*, 1994; Gomez y Correa, 2015). Por este motivo, sumado a su relación con los organismos viables y a que los fosfolípidos constituyen una proporción relativamente estable de la masa celular, PLFA es una herramienta útil para la estimación de la biomasa viable (Lechevalier, 1989). Esta cuantificación puede obtenerse simplemente a partir de la sumatoria de los fosfolípidos microbianos y resulta interesante en términos ecológicos, dado que está asociada a la ocurrencia de muchos procesos microbianos como el secuestro de carbono o la producción de metano (Gomez y Correa, 2015).

La metodología también permite un análisis cualitativo de la comunidad microbiana viable, aunque éste debe realizarse con ciertos recaudos respecto del uso que se le ha dado en la literatura (Frostegård *et al.*, 2011). El motivo principal es que los perfiles de PLFA de una comunidad en particular son resultado tanto de factores estructurales como fisiológicos. Ciertas estructuras de los fosfolípidos están vinculadas a determinados grupos taxonómicos, con distinto nivel de resolución, y pueden ser útiles para cuantificar la abundancia relativa de ese taxón en la comunidad. Sin embargo, los marcadores taxonómicos no siempre coinciden entre distintos autores (Frostegård *et al.*, 2011; Wixon y Balsler, 2013; Kandeler, 2015), con la desventaja adicional de que mucha de la información utilizada para esas clasificaciones proviene de aislamientos microbianos, con lo cual está restringida a los microorganismos cultivables (Bossio y Scow, 1998; Frostegård *et al.*, 2011).

Del mismo modo, algunos ácidos grasos pueden utilizarse como indicadores de status metabólico, como ser déficit nutricional, metabolismo aeróbico/anaeróbico o toxicidad (Gomez y Correa, 2015). En el primer caso, por ejemplo, se sabe que las bacterias responden a la inanición modificando los ácidos grasos de la membrana plasmática y, así, su permeabilidad (Kieft *et al.*, 1994; Bossio y Scow, 1998; Hedrick *et al.*, 2007). La relación entre distintas estructuras de ácidos grasos ha permitido detectar cambios fisiológicos a nivel de la comunidad microbiana ante el hambreado, la desecación o la presencia de compuestos potencialmente tóxicos (Frostegård *et al.*, 1996; Kieft *et al.*, 1997; Lundquist *et al.*, 1999). Por ejemplo, ante condiciones estresantes, algunos

fosfolípidos con estos ácidos monoinsaturados pasan a la forma ciclopropano o modifican su geometría de *cis* a *trans* (Gomez y Correa, 2015).

La información obtenida a partir del análisis de PLFA es interesante y no presenta mayores restricciones con respecto al tipo de suelo a ser analizado (Drenovsky *et al.*, 2004; Ramsey *et al.*, 2006), de manera tal que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la respuesta de las comunidades microbianas del suelo a cambios en el uso de la tierra o el manejo agrícola (*e.g.*, Bossio y Scow, 1998; Esperschütz *et al.*, 2007; Jangid *et al.*, 2011; Montecchia *et al.*, 2011). Sin embargo, la información debe ser analizada teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica, razón por la cual los pioneros en la aplicación de esta metodología al estudio de los suelos, remarcan el valor de los estudios con un enfoque multivariado, que permita detectar cambios estructurales a nivel global (Frostegård *et al.*, 2011). Esos cambios pueden luego tratar de interpretarse en términos de potenciales cambios a nivel taxonómico (Zelles, 1999) o a nivel fisiológico. Wixon y Balser (2013) resumen la utilidad de la metodología diciendo que “PLFA separa distintas clases de microorganismos con diferente morfología, los cuales tienden a diferir también en su estrategia de vida”.

## 1.2 - Justificación

Este estudio se realizó para complementar los datos obtenidos en el Capítulo 2, a nivel de biomasa y función, con datos estructurales de las comunidades microbianas del suelo. La metodología de PLFA contribuye al estudio de estos suelos con un análisis estructural a nivel global, enfocado en la biomasa viable y con perfiles relativamente consistentes entre réplicas (Drenovsky *et al.*, 2004). Por otro lado, resulta un aporte interesante para los antecedentes sobre análisis de PLFA en un escenario de cambio en el uso de la tierra, y en particular en cronosecuencias de cultivo.

## 1.3 - Objetivo

A través de la extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos de los fosfolípidos, se plantea evaluar cambios en la estructura de la comunidad microbiana a lo largo de una cronosecuencia agrícola en términos de biomasa viable, marcadores de grupos taxonómicos (bacterias totales, bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y hongos), indicadores de *status* metabólico y perfiles de composición de ácidos grasos de los fosfolípidos.

## 1.4 - Hipótesis y predicciones

El cambio en el uso de la tierra modifica la estructura (biomasa y composición) de la comunidad microbiana viable (biomasa y composición). Al igual que se planteó en el Capítulo 2, la mayor alteración se observaría con proximidad al desmonte, en respuesta al cambio drástico en la cobertura vegetal y a la gran cantidad de labores que se realizan sobre el suelo en esa etapa. Siguiendo este razonamiento, una vez implementado el sistema agrícola, las comunidades microbianas del suelo se adaptan al nuevo ambiente edáfico. En términos de composición, los cambios en la comunidad microbiana viable responden tanto a modificaciones de tipo fisiológico como de tipo taxonómico, ya que ante el ambiente edáfico condiciona el metabolismo de las CMS a la vez que afecta diferencialmente a distintos grupos microbianos, que podrían verse favorecidos o desfavorecidos.

Predicciones: *Reflejados en la composición de fosfolípidos de membrana, esos fenómenos determinarían una marcada diferencia entre suelos de pedemonte y suelos agrícolas, con mayor similitud entre sitios con una larga historia de cultivo. Los suelos agrícolas también presentarían menor biomasa viable y una diferente abundancia relativa de diferentes marcadores taxonómicos (e.g., mayor abundancia relativa de bacterias Gram positivas, más tolerantes a la desecación, o menor abundancia de hongos, más afectados por el disturbio físico de las prácticas agrícolas) e indicadores de status metabólico (e.g., mayor abundancia relativa de ácidos grasos con grupo ciclopropilo o ramificados, asociados a condiciones más estresantes).*

## **2 - Materiales y métodos**

### **2.1 - Descripción del área bajo estudio**

Ídem Capítulo 2.

### **2.2 - Muestreo y almacenamiento**

Ídem Capítulo 2, con algunas modificaciones. En primer lugar, se analizaron únicamente muestras del año 2013, debido a que esta técnica se incorporó definitivamente al plan con posterioridad al muestreo de 2011, cuando ya no se contaba con cantidad suficiente de muestra en las condiciones requeridas por el método. Por otra parte, por limitantes operativas (costo y tiempo de procesamiento), se analizaron todas las fincas y sitios, pero 2 sub-sitios en lugar de 5, resultando en: 3 fincas \* 4 sitios finca<sup>-1</sup> \* 2 sub-sitios sitio<sup>-1</sup> \* 2 sub-muestras sub-sitio<sup>-1</sup> = 48 sub-muestras (12 por categoría de uso). Se seleccionaron sub-sitios que contaran con datos físico-químicos.

Estas muestras se almacenaron a -50°C, previa liofilización.

### **2.3 - Obtención y cuantificación de PLFA**

#### **2.3.1 - Extracción y fraccionamiento de lípidos, y metilación de los ácidos grasos**

Se utilizó un método optimizado por Palojarvi (2006), basado en la extracción monofásica de lípidos de Bligh y Dyer (1959) y orientado a la obtención de ácidos grasos con función éster, por ser relativamente rápido y confiable frente a otros métodos de extracción más complejos o costosos (Zelles *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2013). Se trabajó con muestras de 4 g de suelo y por duplicado, en 4 pasos: extracción, fraccionamiento para la recuperación de fosfolípidos, metilación en medio básico (Chowdhury y Dick, 2012) y análisis de los ésteres metílicos de los PLFA.

Los lípidos totales se extrajeron en dos etapas. En la primera extracción, se agregó a cada muestra de suelo 1,5 ml de buffer citrato (0,15 M, pH 4), 1,9 ml de cloroformo, 3,7 ml de metanol y 2 ml de solución Bligh y Dyer (cloroformo:metanol:buffer, 1:2:0,8, v/v/v). Las muestras se agitaron en *shaker* orbital a 200 rpm durante 4 h, se centrifugaron a 2000 rpm y se recuperó el sobrenadante para proceder a una segunda extracción con 2,5 ml de solución Bligh y Dyer y una agitación *overnight*. El sobrenadante obtenido se mezcló con el anterior y se procedió al agregado de 3,1 ml de cloroformo y 3,1 ml de buffer citrato. Se mezcló en vórtex y se centrifugó a 2500 rpm para obtener dos fases y recuperar la fase inferior, orgánica, la cual se evaporó en flujo de N<sub>2</sub> y se almacenó a -20°C hasta su uso. Todo el proceso se efectuó al abrigo de la luz.

El fraccionamiento se realizó utilizando columnas de sílica gel (500 mg) para extracción en fase sólida. Una vez activadas las columnas con 6 ml de cloroformo, se suspendió la muestra obtenida en el paso anterior en 3 volúmenes de 200  $\mu$ l de cloroformo. El fraccionamiento en lípidos neutrales, glicolípidos y fosfolípidos, se realizó eluyendo con 6 ml de cloroformo, 12 ml de acetona y 6 ml de metanol, respectivamente. Finalmente, la fracción de fosfolípidos fue recuperada, evaporada en flujo de  $N_2$  y almacenada a  $-20^\circ C$ . Para la metilación en medio básico se disolvieron las muestras en 1 ml de metanol:tolueno (1:1), se les agregó 2 ml de KOH 0,2M en metanol y se incubaron a  $37^\circ C$  durante 15 minutos. Inmediatamente finalizado este período, se les agregó 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), 2 ml de agua milliQ y 0,3 ml de ácido acético para neutralizar la solución. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 1500 rpm para la posterior recuperación de la fase orgánica superior. Este procedimiento se repitió y el producto obtenido en ambas etapas se combinó y evaporó en flujo de  $N_2$ . Previo al análisis, las muestras fueron suspendidas en 300  $\mu$ l de hexano.

### 2.3.2 - Determinación, identificación y cuantificación

Para el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME, del inglés *fatty acid methyl ester*) se utilizó un cromatógrafo gaseoso Agilent 7890A y como detector un espectrómetro de masas Agilent 5997A (GC-MS, de las siglas en inglés *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Se utilizó una columna HP5 autoID-1 mod. 19091J 413 (30 m x 250  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m) y helio como gas *carrier*, y el inyector operó a una temperatura de  $260^\circ C$ . Para la separación cromatográfica el equipo se operó a una temperatura inicial de  $60^\circ C$  durante un minuto y luego se incrementó hasta  $130^\circ C$  (Rampa I de  $10^\circ C \text{ min}^{-1}$ ) y finalmente hasta  $260^\circ C$  (Rampa II  $15^\circ C \text{ min}^{-1}$ ). La temperatura final de  $260^\circ C$  se mantuvo por 15 minutos. Se inyectó 1  $\mu$ l de la solución muestra y se utilizó una relación de *split* 1:50.

Debido a la complejidad de las muestras de suelo, la identificación de los diferentes FAMEs se orientó a aquellos que fueran informativos sobre las comunidades microbianas del suelo. Se partió de un subconjunto de muestras representativo, con suelos de distintas fincas y categorías de uso de la tierra, y en estas muestras se identificaron los compuestos de interés. Para la identificación de los componentes de las muestras se utilizaron dos estándares comerciales: uno de 24 FAMEs bacterianos y otro de 37 FAMEs (BAME-47080U y FAME37-CRM47885, respectivamente; Supelco Inc.). Para confirmar la identidad de FAMEs, o en aquellos casos donde los compuestos no formaran parte de los estándares, se utilizó el software Enhanced ChemStation, MSD ChemStation F.01.00.1903 (Agilent), donde compararon los espectros de masa obtenidos en la muestra con los informados por la Biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*, 2008).

Para la cuantificación de cada compuesto se utilizó el éster metílico del ácido metil-nonadecanoico (19:0) como estándar interno, aplicándose a todas las muestras una cantidad conocida luego de la reacción de metilación (Palojärvi, 2006). La concentración de cada FAME por gramo de suelo se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:  $C_{FAME} (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{AUC_{FAME}}{AUC_{19:0}} \cdot C_{19:0} \cdot \frac{V_m}{P_s}$ . Donde:  $C_{FAME}$  = concentración del ácido graso,  $AUC_{FAME}$  = área bajo la curva del ácido graso,  $C_{19:0}$  = concentración del estándar interno en la muestra,  $V_m$  = volumen de la muestra final obtenida,  $AUC_{19:0}$  = área bajo la curva del estándar interno,  $P_s$  = peso seco de la muestra de suelo. Finalmente, la composición de los distintos ácidos grasos se expresó como pmol PLFA  $\text{g}^{-1}$  suelo, afectando la concentración por el peso molecular de cada ácido graso.

## 2.4 - Nomenclatura de ácidos grasos

De acuerdo con lo utilizado frecuentemente en la literatura, los ácidos grasos se presentan con la nomenclatura omega, adaptando levemente lo propuesto por Wixon y Balsler (Singh *et al.*, 2009; 2013). Cada ácido graso se expresa según la fórmula **A:B $\omega$ X**, donde **A**: n° de átomos de C totales (cadena más eventual ramificación), **B**: n° de dobles enlaces, **X**: posición del doble enlace desde el extremo alifático o metilo terminal. A su vez, se utilizan algunos prefijos para casos especiales: a/i: ramificación terminal anteiso o iso (antepenúltimo y penúltimo átomo de C, respectivamente); cy: grupo ciclopropilo (posición C9-C10); rc: ramificación central de posición desconocida. Asimismo, los sufijos *c/t* indican la geometría de los ácidos grasos insaturados *cis* o *trans*, respectivamente.

## 2.5 - Análisis de los datos

En primer lugar, se calculó la biomasa viable como la sumatoria de C<sub>FAME</sub> de aquellos PLFAs identificados como microbianos (Montecchia *et al.*, 2011). Luego, para la construcción de los perfiles y el análisis de los distintos marcadores, la concentración de cada PLFA se relativizó al contenido total de PLFA en cada muestra.

Se seleccionaron aquellos ácidos grasos que se utilizan como marcadores de distintos grupos taxonómicos o *status* metabólico, con foco en los grupos taxonómicos más frecuentemente analizados y cuyos ácidos grasos de referencia fueron identificados, a saber: bacterias Gram positivas (ácidos grasos con ramificación iso o anteiso), bacterias Gram negativas (grupo ciclopropilo con y sin sus precursores), bacterias totales (suma de los anteriores, con/sin ácidos grasos con ramificaciones centrales) y hongos (18:2 $\omega$ 6,9 y/o 18:1 $\omega$ 9c) (Bossio y Scow, 1998; Zelles, 1999; Kaiser *et al.*, 2010; Buckeridge *et al.*, 2013). Los indicadores de estrés o *status* metabólico calculados son cocientes entre ácidos grasos con distintas estructuras, *e.g.*: ciclopropilo:precursores [(cy17:0+cy19:0)/(16:1 $\omega$ 7+18:1 $\omega$ 7)]; *trans:cis* y saturados:insaturados (Hedrick *et al.*, 2007; Wixon y Balsler, 2013). Otros cocientes, como hongos:bacterias y bacterias Gram+:Gram-, se calcularon para enriquecer la interpretación de los resultados. Además de calcular marcadores, los ácidos grasos se analizaron agrupados por estructura química (*e.g.*, monoinsaturados, ramificados, etc.) (Hedrick *et al.*, 2007).

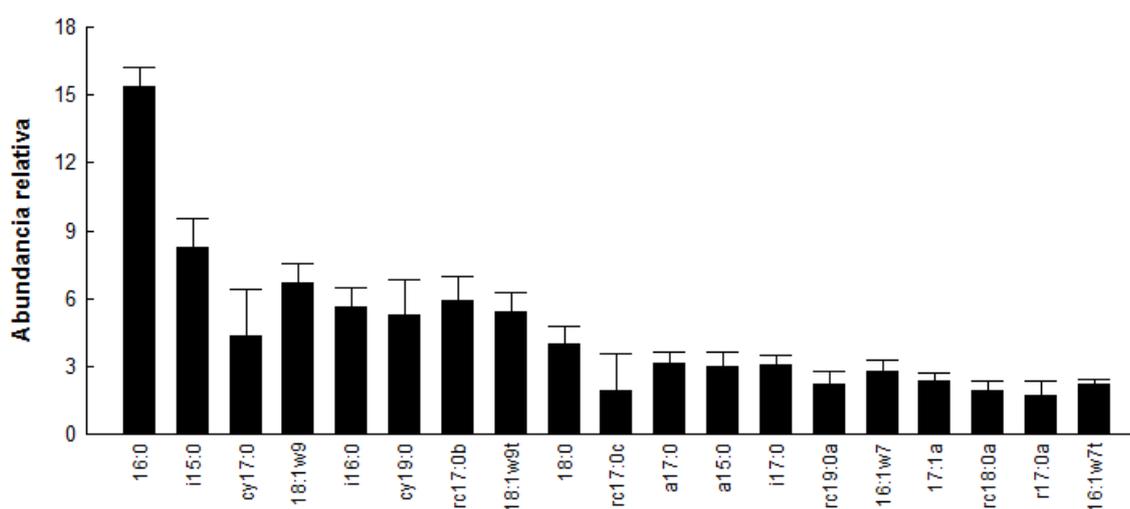
Luego de probar diversas alternativas de ordenamiento y *clustering*, se decidió presentar el análisis multivariado de los perfiles de PLFA como un NMDS (*Non-metric Multidimensional Scaling*), utilizando como métrica la distancia Bray-Curtis (Sorenson *et al.*, 2011). Este análisis se complementó con one-way ANOSIM (*Analysis of Similarities*), que, con la misma métrica, compara el grado de similitud entre distintos ambientes. También se utilizó análisis discriminante, de ordenamiento restringido, para identificar aquellos ácidos grasos con mayor poder explicativo de acuerdo a la variable categórica de edad de uso agrícola. Adicionalmente, se analizó la relación entre los datos de PLFA y las variables físico-químicas/microbiológicas presentadas en el Capítulo 2 utilizando NMDS, Análisis Canónico de Correspondencias (ACC) e índices de correlación de Pearson.

### 3 - Resultados

#### 3.1 - Detección e identificación

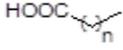
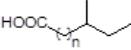
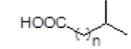
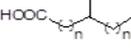
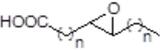
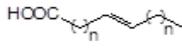
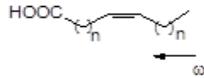
El Cuadro 8 presenta los ácidos grasos detectados en las muestras junto con su tiempo de retención y nomenclatura, y ordenados según su estructura. Se identificaron los ésteres metílicos de 35 ácidos grasos: 8 saturados, 15 saturados ramificados, 2 con grupo ciclopropilo, 10 monoinsaturados o monoenoicos y 1 diinsaturado o dienoico. No se detectaron ácidos grasos con más de dos dobles enlaces ni ácidos grasos de menos de 14 átomos de carbono. Los ácidos grasos más abundantes en el total de las muestras analizadas se presentan en la Figura 17. De los ácidos grasos menos frecuentes, dos de ellos (rc14:0 y rc17:0<sub>c</sub>) estuvieron por debajo del límite de detección en más del 50% de las muestras. Lo mismo se observó para 16:1<sub>a</sub>, rc16:0, rc17:0<sub>d</sub>, 17:1<sub>b</sub>, 19:1<sub>a</sub>, 21:0 y los dos ácidos grasos no identificados, en un 17-43% de las muestras analizadas (Cuadro 8). Estos ácidos grasos y rc14:0 estuvieron por debajo del nivel de detección sólo en muestras de suelos agrícolas.

Como se observa en el Cuadro 8, algunos ácidos grasos insaturados ausentes en los patrones fueron informados teniendo en cuenta el número de átomos de carbono y el número de dobles enlaces sin asignar la posición de los mismos. En el caso de los ácidos grasos con ramificación central, éstos se informaron considerando el número de átomos de carbono y la presencia de la ramificación central, sin asignar su ubicación. Los ácidos grasos con ramificación central presentes en los estándares fueron asignados en base a los tiempos de retención y a los respectivos espectros de masa. En el cromatograma se observaron también picos de composición mixta donde se presentaban iones característicos de más de un tipo de ramificación, lo cual imposibilitó la asignación de sus estructuras a través del perfil de ruptura. Por esta razón, no pudieron identificarse los ácidos grasos con ramificación en el décimo carbono, característicos de las actinobacterias.



**Figura 17.** Abundancia relativa de los ácidos grasos de los fosfolípidos con mayor frecuencia en el total de las muestras. *Las barras de error corresponden al desvío estándar*

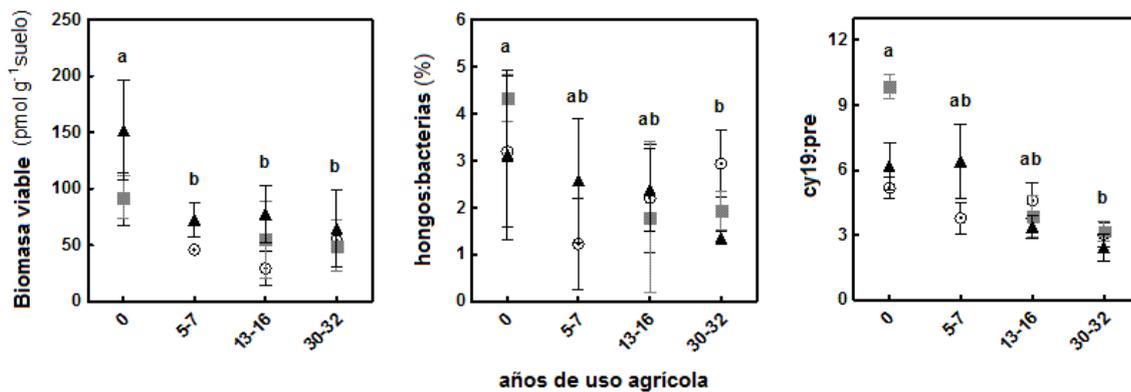
**Cuadro 8.** Ácidos grasos de los fosfolípidos detectados en las muestras de suelo analizadas. Se presentan agrupados por estructura, cada uno con su tiempo de retención (Tr) y porcentaje de ausencia (muestras por debajo del límite de detección).

Estructura	PLFA	Tr	% Ausencia*
<b>Saturados cadena lineal</b> 	<b>14:0</b>	19,57	7
	<b>15:0</b>	21,69	10
	<b>16:0</b>	23,72	0
	<b>17:0</b>	25,65	7
	<b>18:0</b>	27,50	0
	<b>20:0</b>	30,97	10
	<b>22:0</b>	34,17	0
	<b>24:0</b>	37,24	<b>17</b>
<b>Ramificación terminal</b>  	<b>i15:0</b>	20,92	0
	<b>a15:0</b>	21,09	5
	<b>i16:0</b>	22,98	0
	<b>i17:0</b>	24,94	0
<b>Ramificación central</b> 	<b>rc14:0 (11me)</b>	18,78	<b>50</b> 4,8% monte
	<b>rc16:0 (8me)</b>	21,80	<b>17</b>
	<b>rc17:0<sub>a</sub></b>	23,80	5
	<b>rc17:0<sub>b</sub></b>	24,58	0
	<b>rc17:0<sub>c</sub></b>	24,65	<b>57</b> 25% monte
	<b>rc17:0<sub>d</sub></b>	24,72	<b>29</b>
	<b>rc18:0<sub>a</sub></b>	25,73	0
	<b>rc18:0<sub>b</sub></b>	26,43	7
	<b>rc19:0<sub>a</sub></b>	28,21	0
	<b>rc19:0<sub>b</sub></b>	28,27	0
<b>Grupo ciclopropilo</b> 	<b>cy17:0</b>	25,37	0
	<b>cy19:0</b>	29,06	0
<b>Monoinsaturados</b>  	<b>16:1<sub>a</sub></b>	22,58	<b>36</b>
	<b>16:1<math>\omega</math>7<sub>c</sub></b>	23,30	2
	<b>16:1<math>\omega</math>7<sub>t</sub>*</b>	23,50	0
	<b>17:1<sub>a</sub></b>	24,48	0
	<b>17:1<sub>b</sub></b>	25,25	<b>21</b>
	<b>18:1<math>\omega</math>9<sub>c</sub></b>	27,03	0
	<b>18:1<math>\omega</math>9<sub>t</sub></b>	27,15	0
<b>18:1<math>\omega</math>7</b>	27,30	2	
<b>19:1<sub>a</sub></b>	27,63	<b>38</b>	
<b>Diinsaturados</b>	<b>18:2<math>\omega</math>6,9</b>	26,91	5

\* Junto al porcentaje de muestras sin detección se aclara el porcentaje de éstas que correspondió a suelos de monte. De no indicarse, el 100% corresponde a muestras de suelos agrícolas.

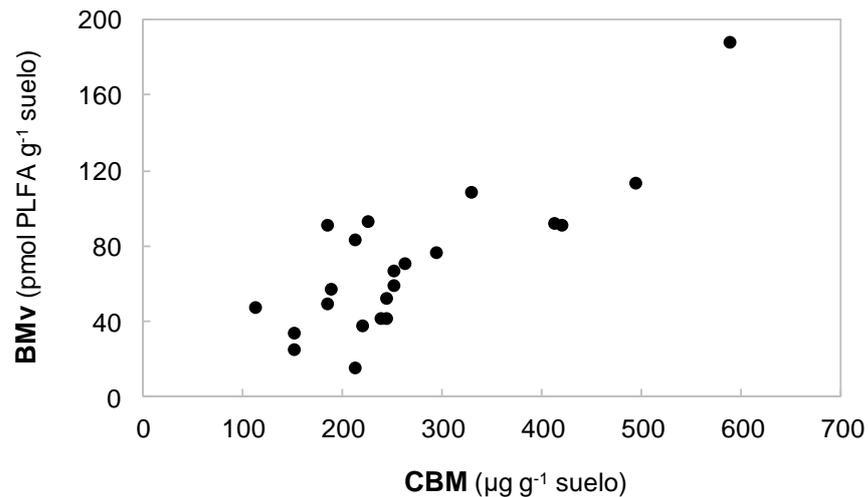
### 3.2 - Biomasa microbiana viable y marcadores taxonómicos

Los suelos agrícolas registraron una menor biomasa viable (BMv), calculada como la sumatoria de los ácidos grasos microbianos, que los suelos de monte, representando una caída de 39-74%, en promedio (Figura 18A). Entre los suelos de monte, los de la finca LR tendieron a mayores valores promedio y presentaron mayor dispersión intra-sitio. Asimismo, la caída porcentual en BMv fue menor y más variable que la encontrada para biomasa total, según los datos de CBM expuestos en el Capítulo 2 (BMv: -36%, CV=148·%; CBM: -52%, CV=39%). La correlación entre BMv y CBM fue positiva y significativa (Pearson=0,82;  $P<0,0001$ ) (Figura 19).



**Figura 18.** Dinámica de A) biomasa viable o PLFA total, B) relación hongos:bacterias y, C) cociente entre el ácido graso cy19:0 y su precursor, en la cronosecuencia del muestreo 2013: 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años bajo uso agrícola. Los símbolos representan diferentes fincas (■ IS, ● PC y ▲ LR). Las barras de error corresponden al desvío estándar. Letras distintas señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

De los marcadores taxonómicos calculados, los únicos asociados al uso agrícola fueron 18:2 $\omega$ 6,9, marcador de hongos (Cuadro 9), y el cociente hongos:bacterias, calculado con este mismo ácido graso (Figura 18B). Ambos evidenciaron una mayor abundancia de hongos en suelos prístinos que en suelos de 30-32 años de cultivo, aunque también se caracterizaron por una gran variabilidad intra-sitio. Al utilizar la suma de 18:2 $\omega$ 6,9 y 18:1 $\omega$ 9c como marcador de hongos, ni el total ni el cociente hongos:bacterias difirieron entre categorías de uso ( $P>0,05$  - datos no presentados). Tampoco se encontraron diferencias en abundancia relativa de bacterias totales, Gram positivas ni Gram negativas, ni tampoco en la relación entre estos dos últimos grupos (Cuadro 9). Una tendencia a destacar en cuanto a marcadores taxonómicos fue la menor abundancia relativa de Gram negativas y el mayor cociente Gram positivas:Gram negativas en los suelos de 5-7 años de cultivo (Cuadro 9).



**Figura 19.** Relación entre la biomasa viable (BMV) y el carbono de la biomasa microbiana (CBM) medido en el Capítulo 2.

### 3.3 - Indicadores de *status* metabólico

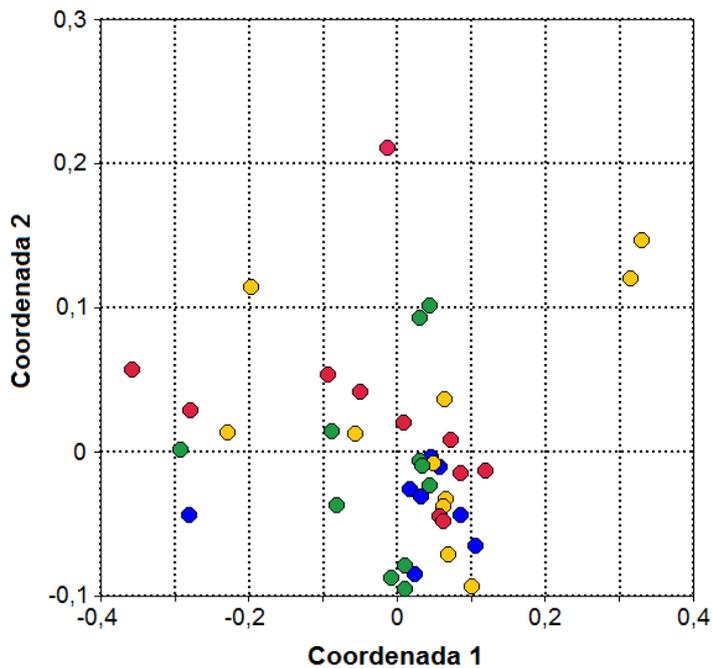
De los diferentes indicadores de estado fisiológico analizados, varios se modificaron a lo largo de la cronosecuencia, aunque no todos en igual sentido (Cuadro 10). La relación entre cy19:0 y su precursor, 18:1 $\omega$ 7, fue superior en suelos de monte que en suelos de larga historia agrícola (Figura 18C; Cuadro 10). La misma relación para cy17:0, en cambio, no presentó respuesta (Cuadro 10), al igual que el cociente cy:pre abarcando cy17:0 y cy19:0 (datos no presentados). La relación entre saturados de cadena lineal y monoinsaturados (sat:mono), así como la relación entre ácidos grasos ramificados iso:anteiso, fue superior en suelos de 5-7 años que en aquellos con 30-32 años de historia agrícola (Cuadro 10). Los suelos de 30-32 años de uso agrícola también presentaron mayor proporción de ácidos grasos de ramificación central sobre saturados de cadena lineal (rc:sat). El cociente entre monoinsaturados de geometría *trans* y *cis*, por último, no difirió entre categorías de uso agrícola.

### 3.4 - Perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos

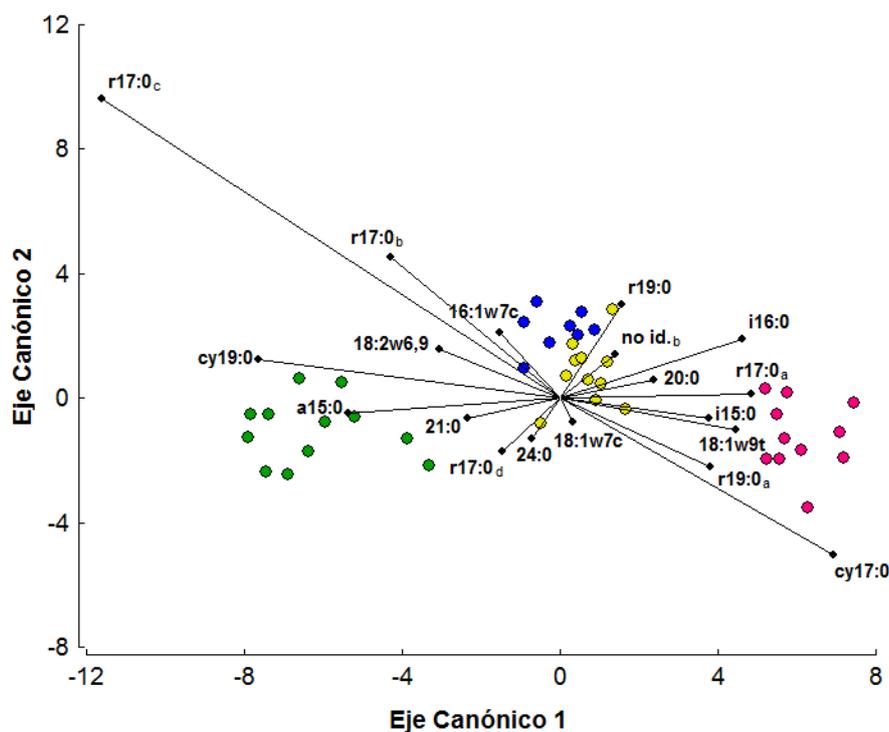
Los análisis multivariados de perfiles de PLFA, incluyendo la totalidad de los ácidos grasos identificados, no evidenciaron ningún agrupamiento claro por uso de la tierra o por finca, tal como se observa en el NMDS de la Figura 20. Un resultado similar se observó analizando los ácidos grasos agrupados por estructura química (Figura S4). El ANOSIM prácticamente no detectó diferencias dadas por el uso, salvo una pequeña distinción entre sitios prístinos y sitios agrícolas de 13-16 y 30-32 años, la cual se observa en el bajo valor R arrojado en ambas comparaciones (R=0,14 -  $P=0,016$  y R=0,11 -  $P=0,029$ , respectivamente). No se encontraron diferencias entre fincas ( $P>0,05$  en todas las comparaciones).

La Figura 21 presenta el biplot del análisis discriminante, previo paso de selección de los ácidos grasos con mayor función discriminante. En ese tipo de figura no importa tanto el ordenamiento de los sitios, que es forzado por el propio análisis, como la ubicación relativa de estos ante las distintas variables. En términos generales, fue difícil encontrar ácidos grasos directamente asociados al uso agrícola. En la Figura 21 se destaca la importancia de dos ácidos grasos, cy17:0 y rc17:0<sub>c</sub>, contrapuestos en su comportamiento

y al parecer relacionados con el tiempo de uso agrícola, con *cy17:0* caracterizando ambientes de mayor antigüedad. Con menor capacidad explicativa, algunos estuvieron asociados a ambientes prístinos (e.g., *cy19:0*, *a15:0*, *21:0* y *18:2 $\omega$ 6,9*), mientras que otros presentaron mayor abundancia relativa en ambientes de 30-32 años de historia agrícola (e.g., *i15:0*, *i16:0*, *rc17:0<sub>a</sub>*, *rc19:0<sub>a</sub>* y *18:1 $\omega$ 9t*).



**Figura 20.** NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) esquematizando la similitud entre perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos de las CMS en la cronosecuencia agrícola del muestreo 2013: monte (verde), 5-7 (azul), 13-16 (amarillo) y 30-32 (rojo) años de uso agrícola.



**Figura 21.** Biplot del análisis discriminante indicando los ácidos grasos con mayor capacidad para discriminar entre ambientes de la cronosecuencia agrícola del muestreo 2013: monte (verde), 5-7 (azul), 13-16 (amarillo) y 30-32 (rojo) años de uso agrícola.

**Cuadro 9.** Marcadores taxonómicos calculados con datos de PLFA para suelos con 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola. *Se presenta el promedio por finca (IS, PC y LR) y el promedio general con el resultado del análisis estadístico.*

	IS			PC				LR				Promedio							
	0	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32				
<b>Hongos</b>	2,35	0,93	1,02	1,60	0,68	1,12	1,49	1,52	1,33	1,20	0,76	1,82	a	1,01	ab	1,08	ab	1,09	b
<b>Bacterias</b>	54,3	54,7	51,9	50,9	56,8	52,7	50,9	52,0	53,9	51,9	56,2	52,39	a	55,34	a	53,10	a	52,99	a
<b>Gram +</b>	26,2	24,4	24,3	23,3	26,9	20,7	23,2	19,1	23,3	20,3	21,6	22,85	a	25,14	a	21,80	a	23,04	a
<b>Gram -</b>	12,6	12,9	11,5	12,9	12,5	14,3	12,4	15,8	13,3	14,7	16,4	13,77	a	12,90	a	13,96	a	13,42	a
<b>Gram +:Gram -</b>	2,08	1,93	2,11	1,83	2,16	1,56	1,91	1,25	1,88	1,50	1,61	1,72	a	2,02	a	1,67	a	1,88	a

*Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola (alfa=0,05).*

**Cuadro 10.** Indicadores de *status* metabólico calculados con datos de PLFA para suelos con 0, 5-7, 13-16 y 30-32 años de uso agrícola. *Se presenta el promedio por finca (IS, PC y LR) y el promedio general con el resultado del análisis estadístico.*

	IS			PC				LR				Promedio							
	0	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32	0	5-7	13-16	30-32				
<b>cy17:pre</b>	1,08	1,48	0,93	1,10	1,00	1,07	1,53	3,45	2,53	2,70	4,50	1,88	a	1,77	a	1,74	a	2,31	a
<b>cy19:pre</b>	9,85	3,93	3,18	5,18	3,80	4,60	3,06	6,18	6,39	3,40	2,40	7,07	a	5,09	ab	3,96	ab	2,88	b
<b>sat:mono</b>	1,46	1,20	1,19	1,10	1,25	1,18	0,91	1,10	1,31	1,15	1,07	1,22	ab	1,28	a	1,18	ab	1,07	b
<b>trans:cis</b>	0,60	0,70	0,72	0,84	0,85	0,85	0,77	0,87	0,76	0,85	0,89	0,77	a	0,80	a	0,79	a	0,79	a
<b>rc:sat</b>	1,02	2,01	1,96	1,63	1,46	1,18	3,30	1,15	1,81	2,41	2,19	1,26	b	1,64	ab	1,86	ab	2,48	a
<b>iso:anteiso</b>	2,85	2,71	2,45	2,92	2,81	2,75	2,45	2,73	3,11	2,80	2,67	2,83	ab	2,96	a	2,75	ab	2,53	b

cy: ciclopropilo (17/19: n° de átomos de C); pre: precursor/es de grupo ciclopropilo; sat: saturados de cadena simple; mono: monoenoicos; rc: ramificación central

*Letras diferentes señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola (alfa=0,05).*

Analizando los diferentes grupos químicos (saturados, monoinsaturados, con ramificación central, con ramificación terminal y con grupo ciclopropilo), el único patrón detectable lo presentaron los ácidos grasos con ramificación central y terminal, que en conjunto fueron más abundantes en los suelos con 5-7 años de cultivo que en los de monte ( $P=0,03$ ).

### 3.5 - Relación con variables funcionales y propiedades físico-químicas del suelo

Los coeficientes de correlación de Pearson revelaron muy pocas asociaciones significativas entre marcadores de PLFA y variables microbiológicas analizadas en el Capítulo 2 (Cuadro 11). La mayoría de las correlaciones reveladas respondieron a una covariación en la cronosecuencia agrícola y por eso no se hará mención a ellas. Un dato llamativo fue que abundancia de hongos no presentó correlación con el carbono de la biomasa microbiana (CBM), pero sí con la respiración basal (RB). La BMv, por su parte, correlacionó con dos variables de eficiencia metabólica que tuvieron escasa respuesta al uso agrícola: positivamente con el cociente metabólico o  $qCO_2$  (RB por unidad de CBM) y negativamente con  $AWCD_{96}:CBM$ , que expresa la respuesta global a la siembra en sustratos carbonados individuales. El  $qCO_2$  también correlacionó positivamente con  $BMv:CBM$ , es decir la proporción de biomasa total en estado viable (Pearson=0,67;  $P<0,01$ ). Por último, los indicadores de *status* metabólico *trans:cis* e *iso:anteiso* también se relacionaron con aspectos metabólicos ( $qCO_2$  y RB, respectivamente).

**Cuadro 11.** Coeficientes de correlación de Pearson entre los marcadores taxonómicos o fisiológicos de PLFA y las variables microbiológicas medidas en el Capítulo 2. *Se presentan correlaciones significativas con  $P<0,01$  (\*\*) y  $P<0,05$  (\*)*

	CBM	RB	HDAF	$qCO_2$	$AWCD_{96}:CBM$
<b>Biomasa viable</b>	0,82 **	0,59 **		0,41 *	-0,43 *
<b>Hongos</b>		0,53 **			-0,40 *
<b>Hongos:bacterias</b>		0,49 **			
<b>Gram - cy19:pre</b>	0,53 **	0,55 **	0,45 *		
<b>trans:cis</b>			0,57 **	0,44 *	
<b>iso:anteiso</b>		0,46 *			

CBM: carbono de la biomasa microbiana; RB: respiración basal; HDAF: hidrólisis de diacetato de fluoresceína;  $qCO_2$ : cociente metabólico (CBM:RB);  $AWCD_{96}$ : *average well color development* a las 96 h; cy19:pre: cociente cy19:0

La salida del análisis canónico de correspondencias no arrojó ningún patrón claro entre la composición de fosfolípidos y las propiedades físico-químicas del suelo (datos no presentados). Al analizar correlaciones por grupo químico, surgieron algunas relaciones interesantes (Cuadro 12). Independientemente del uso, el pH estuvo asociado a dos tipos de estructura: en suelos de mayor pH se encontró una mayor proporción de monoinsaturados y menor abundancia de ramificados totales. Otra variable que pareció tener influencia independientemente del uso fue la textura del suelo: suelos con mayor porcentaje de arcilla presentaron mayor abundancia relativa de ácidos grasos ramificados y de cadena corta (14-15 átomos de carbono), así como una menor abundancia relativa de ácidos grasos de cadena larga (20-24 átomos de carbono). En un análisis complementario se encontró que en los dos primeros casos esa relación estuvo explicada por los ramificados iso y anteiso.

**Cuadro 12.** Coeficientes de correlación de Pearson entre estructuras de PLFA y variables físico-químicas del suelo. *Se presentan correlaciones significativas con  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*)*

	arcilla	pH	CE
<b>Monoenoicos</b>		0,61 **	
<b>18:2<math>\omega</math>6,9</b>			0,48 *
<b>Ramificados</b>	0,54 **	-0,44 *	
<b>Ramif. iso + anteiso</b>	0,46 *		
<b>Saturados 20-24 C</b>	-0,49 **		
<b>14-15 C</b>	0,50 **		
<b>20-24 C</b>	-0,43 *		

CE: conductividad eléctrica

## 4 - Discusión

### *Identificación*

En los perfiles obtenidos se evidencia una escasez tanto de ácidos grasos de cadena corta como de aquellos con grupos oxhidrilo o con tres o más dobles enlaces (poliinsaturados), todas estructuras esperables en el suelo, aunque con escasa aparición en los antecedentes bibliográficos (Zelles *et al.*, 1994; Ruess y Chamberlain, 2010; Kandeler, 2015). Este resultado sugiere la ocurrencia de pérdidas en alguno de los pasos de la obtención de PLFAs, probablemente por limitaciones metodológicas (Zelles, 1999; Wu *et al.*, 2009). Se ha comprobado, por ejemplo, que la metilación alcalina, aplicada en la mayoría de los estudios, puede dar un menor rendimiento que otros métodos de metilación y no recuperar algunas de esas estructuras (Chowdhury y Dick, 2012; Welc *et al.*, 2012). Las características físico-químicas del suelo podrían afectar la eficiencia del proceso de obtención de ácidos grasos, como se encontró para los ácidos húmicos (Nielsen y Petersen, 2000). En este estudio se encontró que los suelos más arcillosos presentaron mayor proporción de ácidos grasos de cadena corta (y menor de ácidos grasos de cadena larga), pero no se encontraron antecedentes similares que describan este fenómeno. En ese caso, otros mecanismos, como la protección física de la biomasa o los compuestos orgánicos, podría estar en juego (Bach *et al.*, 2010).

Por otro lado, se encontró que, en algunas muestras, en su mayoría de suelos agrícolas, algunos ácidos grasos estuvieron por debajo del límite de detección. Este dato resulta interesante ya que estaría indicando que con el cambio en el uso de la tierra algunos fosfolípidos se redujeron a cantidades no detectables, tal como reportaron Montecchia *et al.* (2011) en suelos de la región. No obstante, los ácidos grasos ausentes en ese estudio no coincidieron con los de este trabajo, que fueron principalmente monoinsaturados o de ramificación central, seguidos de saturados lineales de cadena larga. Los ácidos grasos monoinsaturados son característicos de proteobacterias, mientras que los de ramificación central suelen pertenecer a actinobacterias (ramificación en el carbono 10) o bacterias reductoras de sulfato. En relación con las actinobacterias, nuestro resultado sería coherente con la menor abundancia relativa de este grupo en suelos agrícolas hallada en el trabajo de Montecchia *et al.* (2011).

Los ácidos grasos monoinsaturados sólo pudieron identificarse por completo, con la ubicación de su doble enlace, cuando estaban presentes en alguno de los estándares comerciales utilizados. Caso contrario, debieron reportarse de acuerdo al número total de

átomos de C y el número de dobles enlaces. Esto se debió a limitantes en el método de identificación con GC-MS, donde la ubicación del doble enlace es proclive a modificarse por isomerización con la ionización por impacto electrónico (Nichols *et al.*, 1986). Esta identificación parcial impidió la detección y cuantificación de algunos grupos taxonómicos de interés, como los hongos micorrícicos arbusculares (16:1ω5) o las bacterias metanótrofas de tipo I y tipo II estudiadas en el Capítulo 4 de esta tesis (16:1ω8 y 18:1ω8, respectivamente). Una alternativa posible para futuros estudios, además de derivatizaciones previas (Nichols *et al.*, 1986) o un cambio en el método de identificación (*e.g.*, sistema comercial Microbial ID), sería extraer los fosfolípidos de cultivos puros de bacterias metanótrofas y utilizar estos extractos como patrón, de manera similar a lo realizado por Welc *et al.* (2012) para hongos micorrícicos arbusculares.

### ***Biomasa microbiana viable y marcadores taxonómicos***

Los niveles de biomasa viable se vieron reducidos por el cambio en el uso de la tierra en un ~40-50%, pero parecieron no modificarse en los sucesivos años de cultivo. Su dinámica reflejó, aunque con mayor variabilidad, la del carbono de la biomasa microbiana (Capítulo 2). En contraste, Lundquist *et al.* (1999) encontraron que la correlación entre estas variables fue notable en suelos húmedos, pero no en suelos secos. Pese a que esta correlación era en parte esperable (Bååth y Anderson, 2003), se esperaba también que la fracción viable fuera más sensible (Bailey *et al.*, 2002), pudiendo incluso distinguir entre ambientes agrícolas de distinta categoría de uso. En concordancia con nuestros resultados, otros autores hallaron una menor BMv en suelos agrícolas en comparación con sus precursores prístinos (*e.g.*, Yao *et al.*, 2000; Jangid *et al.*, 2011; Montecchia *et al.*, 2011). Un aparente efecto del tiempo bajo cultivo fue la homogeneización: tal como se había observado para otras variables microbiológicas (Capítulo 2), la variabilidad de BMv entre fincas para una misma categoría de uso agrícola se redujo hacia el final de la cronosecuencia. La homogeneización en términos de biomasa total por CBM fue claramente acompañada por la biomasa viable.

Viendo la relación entre biomasa total y viable (BMv:CBM) desde otra perspectiva, se podría decir que la fracción de la biomasa en estado viable fue relativamente constante en ambientes tan contrastantes como suelos de monte prístino y suelos con 30-32 años de cultivo. Este resultado podría relacionarse con los resultados encontrados a nivel de eficiencia metabólica, a pesar de que la fracción viable no necesariamente está en estado activo (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013). En este sentido, BMv:CBM se comportó de manera similar a qCO<sub>2</sub>, con una gran dispersión intra-sitio y ningún patrón claro en respuesta al uso agrícola. Este hecho, sumado a la correlación positiva entre estas dos variables (que equivale a la relación entre RB y BMv), sugiere la presencia de sub-sitios con una mayor fracción de la biomasa en estado viable y activo. La existencia de mecanismos de regulación a pequeña escala, menor que la del sitio, es algo esperable en microbiología de suelos, dada la complejidad y heterogeneidad del sistema (Pietramellara *et al.*, 2002; Voroney y Heck, 2015). Este comportamiento no presentó relación evidente con ninguna de las variables físico-químicas medidas.

Los marcadores taxonómicos, en su mayoría, no reflejaron la sensibilidad de un grupo microbiano en particular. Sin embargo, se encontró una variación en 18:2ω6,9 y hongos:bacterias en los suelos de monte, que podría estar explicado por una mayor abundancia de hongos saprofitos y/o por la presencia de hongos ectomicorrícicos, asociados exclusivamente a especies leñosas (Joergensen y Wichern, 2008). A pesar de ello, ambas variables presentaron gran variabilidad intra- e intersitio, reflejando una heterogeneidad que se redujo en los sitios de 30-32 años, al igual que se observó en otras

variables expuestas en el Capítulo 2. Por otro lado, la sensibilidad de ambas variables al uso agrícola sólo se detectó cuando se utilizó el marcador 18:2 $\omega$ 6,9, contrario a lo hallado por Montecchia *et al.* (2011), donde este marcador no fue sensible pero sí lo fue 18:1 $\omega$ 9c. Esto podría estar relacionado con el hecho de que 18:1 $\omega$ 9 no es exclusivamente marcador de eucariontes, sino que podría estar presente, en baja proporción, en algunas bacterias (Frostegård *et al.*, 2011). Estos autores, asimismo, informaron que la correlación entre 18:2 $\omega$ 6,9 y 18:1 $\omega$ 9c es más marcada en suelos forestales, los cuales, a su vez, suelen presentar rangos de concentración mayores (Frostegård *et al.*, 2011). De hecho, un estudio anterior en suelos de Yungas donde se incluyeron ambientes de selva montana y donde, a su vez, se recuperó un mayor contenido de PLFA total (biomasa viable ~7-50 nmol g<sup>-1</sup>), la concentración de 18:1 $\omega$ 9 en suelos prístinos sí fue mayor que en suelos agrícolas (Montecchia *et al.*, 2011).

Otros trabajos también reportaron una caída en hongos y hongos:bacterias (*e.g.*, Yao *et al.*, 2006; Postma-Blaauw *et al.*, 2010), además de cambios en otros grupos taxonómicos, en respuesta al cambio en el uso de la tierra (*e.g.*, Waldrop *et al.*, 2000; Drenovsky *et al.*, 2010). En el mencionado estudio de Montecchia *et al.* (2011), por ejemplo, los suelos cultivados presentaron menor abundancia de hongos (18:1 $\omega$ 9c), de bacterias y, dentro de éstas, actinobacterias, pero la relación hongos:bacterias no presentó diferencias entre ambientes. Las pasturas constituyen un caso particular, como se discutió para otras variables (*e.g.*, biomasa microbiana y materia orgánica), y podrían incluso presentar mayor abundancia de hongos que suelos forestales (*e.g.*, (Smith *et al.*, 2014). En este aspecto, la importancia del uso que se le esté dando al suelo, agrícola o pastoril, está en parte dada por la agregación del suelo, ya que los hongos están asociados principalmente a agregados de mayor tamaño (Voroney y Heck, 2015), como se encontró en algunos trabajos (Bach *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2014). En una cronosecuencia agrícola como la aquí estudiada, sería esperable encontrar mayores niveles de agregación en el suelo no disturbado que en los suelos agrícolas (Six *et al.*, 2002; Voroney y Heck, 2015), y, de hecho, en suelos aladaños ya ha sido detectado un detrimento en la fertilidad física (Rodolfo Gil, INTA Castelar, comunicación personal).

En cualquier caso, los resultados aquí obtenidos no garantizan que no existan diferencias a nivel de grupos taxonómicos entre categorías de uso, sino que al menos no pudieron ser detectadas en la fracción viable utilizando esta metodología y con las limitantes que se presentaron a la hora de la identificación de algunos ácidos grasos. A diferencia de otras metodologías de extracción más complejas, la aquí utilizada no permite detectar PLFAs inusuales o presentes en bajas concentraciones, con lo cual podría estar perdiéndose alguna fracción sensible (Zelles, 1999). Asimismo, es importante tener en cuenta las precauciones ya mencionadas, en particular sobre la selección de los ácidos grasos marcadores y la interferencia de los aspectos fisiológicos sobre la estructura de los fosfolípidos (Frostegård *et al.*, 2011), pero también sobre la relación entre PLFA y abundancia celular, que podría ser una fuente de error al comparar organismos de diferente estructura como hongos y bacterias (Hedrick *et al.*, 2007).

### ***Indicadores de status metabólico***

Los cocientes calculados para evaluar el estado fisiológico de la comunidad arrojaron resultados algo contradictorios. Por un lado, se observó una reducción de los cocientes mono:sat e iso:anteiso entre 5-7 y 30-32 años de cultivo. Los cocientes sat:mono e iso:anteiso se consideran positivamente asociados a condiciones de estrés nutricional (Kieft *et al.*, 1997; Bach *et al.*, 2010), y en este caso podrían estar señalando la presencia de comunidades menos estresadas en suelos con más antigüedad de cultivo, quizás como

resultado de un proceso de adaptación gradual al ambiente agrícola. No obstante, los suelos con 30-32 años de cultivo también presentaron una mayor proporción de ácidos grasos con ramificación central (rc:sat) que podría ser interpretada como condiciones estresantes en las comunidades microbianas de esos suelos. La relación entre ácidos grasos ramificados y saturados no es frecuentemente utilizada como indicador de *status* metabólico, pero se calculó porque se ha encontrado que la proporción de ramificados fue mayor con menor disponibilidad de sustratos carbonados y de oxígeno (Bossio y Scow, 1998; Bossio *et al.*, 1998). Los ácidos grasos ramificados, a su vez, podrían estar indicando mayor abundancia de bacterias Gram positivas en esos suelos, y este grupo microbiano precisamente se caracteriza por su pared celular engrosada, que les otorga más resistencia a las fluctuaciones ambientales (Schimel *et al.*, 2007). La abundancia de ácidos grasos fue alta en términos generales, y esto coincide en parte con lo obtenido para la relación *trans:cis*, que no se modificó en la cronosecuencia pero fue relativamente alta en todos los suelos (~0,7-0,8, cuando 0,5 se considera un valor umbral por encima del cual hay hambreado) (Gomez y Correa, 2015).

Los resultados en el cociente ciclopropilo:precursores fueron contradictorios entre cy17:pre y cy19:pre, derivando en que el cociente cy:pre no resultara un indicador consistente de estrés, tal como se había registrado, *in vitro* y en suelos, ante situaciones como hambreado, anaerobiosis o acidez (Kieft *et al.*, 1997; Bossio y Scow, 1998; Hedrick *et al.*, 2007), e incluso ante disturbio físico por labranza (Chaer *et al.*, 2009b). Ninguno de estos factores explicaría el mayor cy19:pre en los suelos de monte, según se observó en datos de materia orgánica, nutrientes y pH, entre otros (Capítulo 2). Según Bossio y Scow (1998), este cociente podría ser confuso para interpretar cambios a nivel fisiológico debido a que la proporción de ácidos grasos con grupo ciclopropilo puede variar con cambios a nivel taxonómico, además de que ha mostrado respuesta a factores ambientales muy diversos. Por otro lado, estos autores alegan que una modificación significativa en la proporción de monoinsaturados, que no necesariamente responde a una transformación a ciclopropilo, podría confundir los efectos observados.

Siguiendo la discusión de Bossio y Scow (1998), aquí también se encontró que estos cocientes son algo ambiguos a la hora de evaluar cambios fisiológicos en muestras de suelo, en particular cuando no se está evaluando la respuesta a un tratamiento concreto (*e.g.*, calor o hambreado). Muchos de estos marcadores están basados en experimentos *in vitro* con cultivos puros, mientras que, en el suelo, además de tratarse de una muestra compleja, las condiciones metabólicas de los microorganismos son muy diferentes (en general de fase estacionaria), con lo cual estos cambios podrían no ser detectados (Ruess y Chamberlain, 2010). Por último, estos marcadores fisiológicos o de *status* metabólico tienen la limitante de involucrar estructuras de ácidos grasos características de bacterias, en especial Gram negativas, y por ende estarían evaluando el potencial estado fisiológico sólo en esa fracción de la comunidad microbiana.

### ***Perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos***

Al comparar los perfiles de fosfolípidos de los distintos suelos no se encontró un agrupamiento de los sitios por uso de la tierra en ninguno de los métodos de análisis ni al agrupar los ácidos grasos por su estructura química. A pesar de que parecen haberse perdido ciertas estructuras de ácidos grasos en algunos suelos agrícolas, esto no tuvo suficiente impacto en la composición de PLFA. De hecho, el ANOSIM señaló diferencias muy leves entre el ambiente de monte y aquellos con larga historia de uso. Por otra parte, tampoco se corroboró el proceso de homogeneización de las comunidades microbianas del suelo observado en un muestreo anterior para otras variables, donde la historia de

cultivo llevó a que las comunidades microbianas del suelo fueran más uniformes en términos de estructura y función (Montecchia *et al.*, 2015; Capítulo 2).

Estos resultados contrastan con la sensibilidad que se le ha atribuido al método de PLFA en comparación con otras técnicas de perfiles de comunidades microbianas (Ramsey *et al.*, 2006). Son varios los trabajos que hallaron una respuesta sensible al comparar suelos bajo diferentes usos, incluidos casos de comparación entre suelos prístinos/reforestados y suelos bajo manejo agrícola/pastoril (*e.g.*, Yao *et al.*, 2000, 2006; Bossio *et al.*, 2005; Jangid *et al.*, 2011; Tischer *et al.*, 2015) y, entre estos últimos, en suelos de la misma región (Montecchia *et al.*, 2011). Analizando un subconjunto de los fosfolípidos extraídos, estos autores detectaron un claro agrupamiento de suelos de selva montana y de pedemonte de Yungas, y una marcada separación entre éstos y los suelos bajo agricultura. Sin embargo, también existen trabajos reportando un resultado similar al hallado aquí. Yao *et al.* (2006), por ejemplo, encontraron que pasturas de diferente antigüedad, desde 1 hasta 95 años, presentaron una composición de fosfolípidos muy similar, al igual que se observó en otro estudio en cronosecuencia de plantaciones de té (Dong *et al.*, 2008). En conjunto, estos antecedentes sugieren que los perfiles de los ácidos grasos de los fosfolípidos pueden ser sensibles a las condiciones impuestas por el uso de la tierra, pero que existen otros factores que los condicionan y que podrían enmascarar esas diferencias.

En cualquier caso, y como ya se mencionó en la Introducción, no hay que olvidar que esta técnica está evaluando la estructura de la comunidad microbiana viable y que no sólo responde a cambios taxonómicos sino también fisiológicos (Frostegård *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta esto último, se podría pensar que esta similitud en los perfiles de PLFA de distintas categorías de uso agrícola, que se acompaña de una alta variabilidad intra-sitio, podría responder en parte a las condiciones del suelo al momento del muestreo. Como se explicó en el Capítulo 2, en el muestreo de 2013 los suelos se encontraban en una condición de déficit hídrico severo, que fue notable incluso en los ambientes de monte prístino. Debido a que los fosfolípidos de membrana son afectados por las condiciones hídricas y que hay estructuras asociadas a la protección contra la desecación, sería esperable que todos los suelos respondan de manera similar (*e.g.*, Lundquist *et al.*, 1999; Williams, 2007; Moore-Kucera and Dick, 2008). Teniendo en cuenta esto, no es llamativo que, de los ácidos grasos más abundantes en las muestras de suelo, buena parte presenten una ramificación o un grupo ciclopropilo, debido a que éstas son cambios estructurales que ocurren en respuesta al estrés (Kieft *et al.*, 1997; Hedrick *et al.*, 2007). Del mismo modo, un factor estresante como la sequía podría estar seleccionando a favor de ciertos grupos taxonómicos, de los cuales algunos se caracterizan por ciertas estructuras de PLFA en su membrana plasmática. Esta hipótesis para explicar lo obtenido en términos de PLFA se prueba en el Capítulo 4 donde, de hecho, los perfiles de PLFA de las CMS fueron similares entre sí luego de acontecido el estrés hídrico, pero, al cabo de 40 días de recuperación, tendieron a agruparse principalmente por el uso de la tierra.

## 5 - Conclusiones

A través de los análisis de PLFA, la comunidad microbiana viable se mostró relativamente poco sensible al cambio en el uso agrícola, salvando BMv, que se redujo en los primeros años de la cronosecuencia y no difirió entre ambientes agrícolas, al igual que CBM en el Capítulo 2. La abundancia relativa de hongos y los ácidos grasos de 19 C con grupo ciclopropilo respondieron sensiblemente al uso agrícola, aunque ese efecto negativo fue detectable recién en suelos con 30-32 años de cultivo, con lo cual no se pudo observar un proceso de estabilización. En línea con este resultado, los perfiles de PLFA

no se modificaron a lo largo de la cronosecuencia. Algunas estructuras de ácidos grasos se redujeron a valores no detectables en muestras agrícolas, pero no se encontraron ácidos grasos característicos de un ambiente en particular. La falta de patrón, sumada a la prevalencia general de algunos ácidos grasos con estructuras asociadas a condiciones estresantes, apunta a que los PLFA de las CMS de todos los ambientes podrían ser resultado de las condiciones de déficit hídrico al momento del muestreo (mayo 2013). El análisis de las muestras de 2011 habría permitido analizar con más certeza esta probabilidad.

## **CAPÍTULO 4**

**ABUNDANCIA DE BACTERIAS METANÓTROFAS EN SUELOS DE UNA  
CRONOSECUENCIA DE USO AGRÍCOLA DEL NOA**



## 1 - Introducción

### 1.1 - Antecedentes y presentación del problema

El suelo intercambia gases con la atmósfera y, en la mayoría de los casos, son los procesos que en él ocurren los que regulan la calidad y cantidad de ese flujo. Es conocida la reputación del suelo como fuente de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), principalmente como producto de la respiración aeróbica, y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), producto intermediario de la desnitrificación. También ha recibido considerable atención la emisión de metano (CH<sub>4</sub>) en suelos anegados natural o artificialmente (Nazaries *et al.*, 2013). Tanto el N<sub>2</sub>O como el CH<sub>4</sub> son producidos en condiciones anaeróbicas, pero, este último ha recibido menos atención en suelos no anegados. A pesar de tener una concentración 200 veces menor en la atmósfera, el CH<sub>4</sub> es 25 veces más potente que el CO<sub>2</sub> para retener calor (Aronson *et al.*, 2013), característica que le asigna el tercer lugar entre los gases con mayor efecto invernadero, luego del CO<sub>2</sub> y el agua (IPCC, 2007 – Ho *et al.*, 2013). Las actividades humanas han estimulado un incremento del metano atmosférico de alrededor del 150% en los últimos 150 años, desde unos 0,7 ppm a aproximadamente 1,8 ppm (Aronson *et al.*, 2013).

La emisión de metano hacia la atmósfera es el resultado del balance entre su producción (metanogénesis) y su consumo u oxidación (metanotrofia). La mayor parte de la producción de metano tiene un origen biótico y es resultado de la actividad de un grupo específico de arqueobacterias, los metanógenos, que liberan este compuesto como producto de la respiración anaeróbica (Aronson *et al.*, 2013). El metano se produce en grandes cantidades en ambientes anóxicos, como pantanos o suelos encharcados, o en el rumen; pero también ocurre metanogénesis en suelos bien aireados, gracias a la presencia de microambientes anóxicos o a condiciones anóxicas temporales (Le Mer y Roger, 2001; Angel *et al.*, 2012; Nazaries *et al.*, 2013). Ese metano puede ser utilizado por bacterias especializadas, los metanótrofos u oxidadores de metano. En condiciones aeróbicas, la oxidación biológica del metano es llevada a cabo casi en su totalidad por Proteobacterias, bacterias Gram negativas con un metabolismo aerobio estricto que utilizan el metano y metanol como únicas fuentes de carbono y energía (Ho *et al.*, 2013). Las Proteobacterias metanótrofas se clasifican en dos grupos, tipo I o *Gammaproteobacteria* (familia *Methylococcaceae*) y tipo II o *Alphaproteobacteria* (familias *Methylocystaceae* y *Bejerinckiaceae*), en base a caracteres fisiológicos, morfológicos, filogenéticos y bioquímicos (Bodelier *et al.*, 2000; Knief, 2015). Funcionalmente, los metanótrofos también se clasifican en dos grupos según su afinidad por el sustrato: de baja afinidad (>10 ppm) y de alta afinidad (hasta 1,8 ppm de metano) (Nazaries *et al.*, 2013). Estos últimos representan un gran potencial para el rol del suelo como destino (mitigador) de metano, por oxidar el sustrato a concentraciones similares a la atmosférica. La metanotrofia es predominante en límites óxicos-anóxicos y es particularmente importante en el suelo, en especial en tierras altas, donde se oxida el metano (50-90%) producido en el subsuelo antes de llegar a la superficie, regulando así las emisiones a la atmósfera (Conrad, 2009). El aporte del consumo biológico a la mitigación del metano atmosférico es relativamente pequeño si se lo compara con los procesos abióticos de oxidación que ocurren en la tropósfera. No obstante, la oxidación biológica podría aumentar su relevancia con el paulatino incremento en la concentración atmosférica de metano, e incluso de CO<sub>2</sub>, si se comprueban a campo algunas observaciones experimentales (Irvine *et al.*, 2012; Aronson *et al.*, 2013).

En el suelo, el principal regulador de la actividad de metanógenos y metanótrofos es el contenido hídrico, a través de la modificación de la tensión de oxígeno. Se ha registrado

un aumento en la metanogénesis y una reducción en la metanotrofia (*i.e.*: mayor producción neta de metano) en condiciones de saturación hídrica (Aronson *et al.*, 2013). De esto se deduce que, además de las precipitaciones, todos los factores edáficos que estén involucrados en la retención hídrica tendrán algún nivel de regulación en la emisión de metano: la porosidad, la densidad aparente y la textura, por ejemplo, han mostrado condicionar la actividad de metanógenos y metanótrofos (Smith *et al.*, 2003). Otros factores, como temperatura y pH, han mostrado afectar la actividad de metanógenos, pero no tanto de oxidadores del metano, cuya actividad se mantuvo tanto a pH 3,5 como 8 (Nazaries *et al.*, 2013).

Si los cambios en el ambiente edáfico pueden alterar el flujo de metano hacia la atmósfera, es esperable que las prácticas de manejo y el cambio en el uso del suelo tengan un impacto sobre éste. Los estudios sobre los efectos del manejo no son muchos, pero por ahora permiten inferir que los fertilizantes nitrogenados inorgánicos podrían inhibir a los metanótrofos a la vez que estimularían a los metanógenos; y que otras prácticas (*e.g.*: abono orgánico, siembra directa) podrían favorecer la oxidación del metano (Le Mer y Roger, 2001; Nazaries *et al.*, 2013). Estos autores concluyen que, más allá del manejo escogido, las tierras arables son consideradas una fuente neta de metano, mientras que los bosques de tierras altas parecen ser los suelos con mayor fuerza como destino de metano, seguidos por las tierras altas no cultivadas y las pasturas. En línea con esto, se ha observado un incremento en la emisión de metano al deforestar y cambiar el uso de suelos de bosque o pastizal a suelos agrícolas (Verchot *et al.*, 2000; Rachid *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013), el cual se atribuye principalmente a cambios estructurales en la comunidad metanotrófica (Tate, 2015). Por ejemplo, se observaron cambios en la composición de metanótrofos del tipo II al tipo I (Nazaries *et al.*, 2013). Estos dos grupos parecen diferir en su ecología y estrategia de vida, lo cual permitiría mantener la función ante fluctuaciones ambientales (Ho *et al.*, 2013, 2016). Sin embargo, también se ha reportado una caída en la abundancia de metanótrofos en respuesta al desmonte (Lammel *et al.*, 2015a; Lammel *et al.*, 2015b; Paula *et al.*, 2014). Dependiendo de la intensidad del disturbio, la recuperación de la metanotrofia con reforestación puede tomar períodos de tiempo de diferente magnitud (Tate, 2015); un caso extremo, en Escocia y Dinamarca, reportó que fueron necesarios casi 100 años para retornar a los niveles del suelo forestal prístino (Priemé *et al.*, 1997).

Según las revisiones de Aronson *et al.* (2013) y Nazaries *et al.* (2013), se requieren más estudios que indaguen sobre la adaptación ecológica de microorganismos asociados a las emisiones de metano en distintos escenarios ambientales y de manejo. Dado que una gran proporción de los microorganismos metanótrofos no son cultivables, adquieren gran relevancia los estudios con un enfoque molecular (Nazaries *et al.*, 2013; Knief, 2015). Estudios moleculares sobre la expresión o abundancia de metanótrofos bajo distintas condiciones ambientales han permitido vincular, al menos en parte, los cambios estructurales con los procesos observados en el suelo (*e.g.*, Seghers *et al.*, 2003; Levine *et al.*, 2011; Juottonen *et al.*, 2012; Lammel *et al.*, 2015a). Al tratarse de una función llevada a cabo por un grupo específico (pocos taxones microbianos filogenéticamente distintos) y especializado, es esperable que sea más sensible a cambios en la estructura (composición y abundancia) de la comunidad microbiana que otros procesos biogeoquímicos (Aronson *et al.*, 2013). La información arrojada por este tipo de estudio no sólo aporta a la comprensión de los procesos vinculados al ciclado del metano, y por ende del carbono, sino que también podría ser útil para la incorporación de variables biológicas a los modelos predictivos (Nazaries *et al.*, 2013).

La abundancia de estos grupos funcionales en el suelo puede cuantificarse con la técnica de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), utilizando un gen marcador específico involucrado en el procesos de metanotrofia, *pmoA*, que codifica para la subunidad alfa de la metano-monooxigenasa particulada (pMMO), la cual está presente en la gran mayoría de los metanótrofos cultivables (Horz *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2016). El gen *pmoA* es ampliamente utilizado como marcador ambiental de metanótrofos y su filogenia ha mostrado ser congruente con la del gen 16S rRNA (Reim *et al.*, 2012). En el caso de los metanótrofos de tipo I y tipo II, el gen 16S rRNA también puede utilizarse como marcador de esos dos grupos taxonómicos; metanótrofos pertenecientes a *Gamma-* o *Alphaproteobacteria*, respectivamente (Tsien *et al.*, 1990; Huang y Zhong, 2015).

## 1.2 - Justificación

Para profundizar en el conocimiento de los suelos de la cronosecuencia agrícola y sus comunidades microbianas, se encaró un estudio a nivel de grupos funcionales que participan en el ciclo del carbono a través de las transformaciones del metano, tercer gas de efecto invernadero más importante.

Los metanótrofos han adquirido gran reconocimiento debido a que tienen la capacidad de oxidar el metano y, por ende, proveer un servicio ecosistémico clave, al reducir las emisiones e incluso la concentración atmosférica de este gas. Por otro lado, tienen la particularidad de ser específicos y especializados, y, por lo tanto, podrían ser más susceptibles al disturbio impuesto por la agricultura, comprometiendo la ocurrencia de esa función en el suelo. Finalmente, la cuantificación de metanótrofos de tipo I y los de tipo II permitirá inquirir a grandes rasgos en la estructura de este grupo funcional y de dos grupos que presentan diferente estrategia de vida.

## 1.3 - Objetivo

A partir de la cuantificación de genes marcadores (funcionales y taxonómicos) por la técnica de qPCR, estimar la abundancia de bacterias metanótrofas totales y bacterias metanótrofas de tipo I y de tipo II (*Gamma-* y *Alphaproteobacteria*, respectivamente) en suelos de una cronosecuencia agrícola, de manera de caracterizar la importancia y, a grandes rasgos, la composición de este grupo funcional.

## 1.4 - Hipótesis y predicciones

El cambio en el uso de la tierra imprime fuertes cambios en el ambiente edáfico que pueden afectar selectivamente a distintos grupos microbianos de acuerdo a su capacidad de resistir y recuperarse del disturbio impuesto por las prácticas de desmonte, y de adaptarse a las condiciones edáficas dadas por el manejo agrícola. En este sentido, principalmente debido a la creciente densificación (y menor aireación) que induce el uso agrícola en suelos de la zona bajo estudio, el cambio en el uso de la tierra altera la abundancia de bacterias metanotróficas u oxidadoras del metano, de metabolismo aerobio obligado. Este efecto puede contrarrestarse por una mayor disponibilidad de sustrato en suelos densificados, ya que se favorecen procesos anaeróbicos y podría aumentar la metanogénesis. Debido a que las bacterias metanótrofas presentan dos grandes grupos taxonómicos que difieren en su estrategia de vida (metanótrofos de tipo I o *Gammaproteobacteria* y de tipo II o *Alphaproteobacteria*), el ambiente agrícola también altera la composición de este grupo funcional.

Predicciones: *Los suelos cultivados presentarían una menor abundancia de metanótrofos y una mayor abundancia de metanógenos (observada a través del número de copias de genes marcadores para cada uno de estos grupos funcionales) que los suelos prístinos, y estas diferencias podrían exacerbarse con el tiempo bajo uso agrícola, aunque también podrían debilitarse debido a una potencial mayor disponibilidad de metano en suelos cultivados. Los suelos cultivados también presentarían mayor abundancia de metanótrofos de tipo II, en relación a los de tipo I, que los suelos prístinos, ya que son más tolerantes a condiciones estresantes.*

## **2 - Materiales y métodos**

### **2.1 - Descripción del área bajo estudio**

Ídem Capítulo 2.

### **2.2 - Muestreo y almacenamiento**

El muestreo y acondicionamiento se realizó tal como se detalla en el Capítulo 2, con almacenamiento de las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los análisis se realizaron para todas las fincas y sitios, pero, por limitantes operativas y de costo, se utilizaron muestras compuestas de los 5 sub-sitios por cada sitio.

### **2.3 - Preparación y análisis de las muestras**

#### **2.3.1 - Extracción de ADN y cuantificación**

El ADN total se extrajo de 0,25 g de muestra de suelo utilizando el kit *Power Soil DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, Inc.) según las indicaciones provistas e incluyendo un paso de lisis alternativo ( $70^{\circ}\text{C}$ , 10 min). El ADN extraído se cuantificó, en primer lugar, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X y tinción con SYBR® Safe, utilizando Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker 3 (Thermo Scientific) y el software *GeneTools* (Syngene). La cuantificación también se realizó por espectrofotometría midiendo la  $A_{260}$  con *GeneQuant RNA/DNA calculator spectrophotometer* (Pharmacia Biotech). Todas las preparaciones de ADN se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.3.2 - Optimización de condiciones de PCR**

Los genes evaluados para los grupos de interés, con sus respectivos sets de *primers*, se presentan en el Cuadro 13. Mientras que para metanótrofos totales se seleccionó un *primer* específico para el gen marcador funcional, para metanótrofos de tipo I y II se utilizaron también *primers* específicos para un gen marcador taxonómico, el gen 16S rRNA de bacterias metanótrofas pertenecientes a *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* metanótrofas, respectivamente. En el caso de *primers* con los cuales no se logró el producto de amplificación esperado, se chequeó su secuencia utilizando BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) de la NCBI (*National Library of Medicine*). Los *primers* 197f, 142f y mb661r no estaban correctamente citados en la literatura (e.g., Tsien *et al.*, 1990; Eller *et al.*, 2001; Kolb *et al.*, 2003) y debieron ser reemplazados por su reverso complementario.

**Cuadro 13.** Grupos funcionales estudiados por ensayos de qPCR, con sus genes específicos y *primers* utilizados para su amplificación. Se indica nombre y secuencia de los *primers* forward (*f*) y reverse (*r*) junto con el tamaño en pares de bases (*bp*) de su producto de amplificación.

Grupo funcional	Gen blanco	<i>Primers</i> (f/r)	Secuencia del <i>primer</i> (5' → 3')	Producto PCR (bp)	Referencias
Metanótrofos totales	<i>pmoA</i>	a189f mb661	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTTACC	508	[1]
Metanótrofos tipo I	16S rRNA	197f 533r	AAGCGGGGGATCTTCGGACC TTACCGCGGCTGCTGGCAC	337	[2, 3]
Metanótrofos tipo II	16S rRNA	142f 533r	GTTCGGAATAACTCAGGG TTACCGCGGCTGCTGGCAC	350	[2, 3]

[1] Costello y Lidstrom, 1999; [2] Wellner *et al.*, 2011; [3] Huang y Zhong, 2015

**Cuadro 14.** Perfil térmico, concentración de *primers* y cantidad de ADN utilizados en la amplificación de cada gen por qPCR

Grupo funcional (gen)	[ <i>primers</i> ] (nM)		[ADN] (ng reacción <sup>-1</sup> )	Perfil térmico
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>		
Metanótrofos totales ( <i>pmoA</i> )	333	333	4	95°C 30" / <u>55°C 30"</u> / 72°C 30" (40 c.)
Metanótrofos tipo I (16S rRNA)	267	267	8	95°C 60" / 63°C 30" / 72°C 30" / <u>83°C 10"</u> * (35 c.)
Metanótrofos tipo II (16S rRNA)	133	67	8	95°C 30" / <u>60°C 30"</u> / 72°C 30" (35 c.)

El perfil térmico muestra la temperatura y duración de las distintas etapas: desnaturalización, alineamiento, elongación y, si corresponde, lectura de fluorescencia. Entre paréntesis se indica el número de ciclos (c.) y el paso de lectura de fluorescencia se indica con subrayado.

La puesta a punto de las condiciones de amplificación se realizó a partir de muestras ambientales (*i.e.*, ADN de suelos de la región). Las condiciones de amplificación se definieron analizando los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa 1% en TBE 1X revelados con SYBR® Safe. El tamaño del producto amplificado se definió por comparación con el estándar 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### 2.3.3 - Preparación de estándares para los ensayos de qPCR

Como estándares para qPCR se utilizaron plásmidos linearizados conteniendo la secuencia blanco. La clonación de los tres fragmentos de genes se realizó con el kit pGEM®-T Easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ligado se realizó con producto de PCR amplificado a partir de muestras ambientales y purificado (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN). Los plásmidos se purificaron con el kit *GeneJET Plasmid Miniprep* y luego se linearizaron con la enzima de restricción *Pst*I (Promega). Finalmente, el plásmido linearizado se purificó nuevamente con el kit QIAquick y se cuantificó por  $A_{260}$  con NanoDrop (Thermo).

Para confirmar la especificidad e identidad del producto amplificado y clonado, por cada secuencia de interés se enviaron plásmidos purificados de dos clones al servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del INTA Castelar. Las secuencias obtenidas se analizaron por alineamiento con el programa Nucleotide BLAST® (base de datos GenBank®) para chequear que el producto amplificado coincidiera con secuencias de los grupos de interés. Para las secuencias clonadas del gen *pmoA* se encontró, por ejemplo, un 76-80% de identidad con el gen *pmoA* de cepas de los géneros *Methylocaldum*, *Methylobacter* y *Methylosinus*, y un 93-96% de identidad con varios clones ambientales (no cultivados) de ese gen. En el caso de las secuencias clonadas del gen 16S rRNA de los metanótrofos de tipo I y tipo II, éstas mostraron un 98-99% de identidad con cepas de *Sphingomonas* spp. (*Gammaproteobacteria*), y 81-85% con cepas de *Methylocaldum* spp. (*Alphaproteobacteria*), respectivamente.

En cada ensayo de qPCR, la curva estándar se confeccionó realizando diluciones seriadas al décimo del plásmido linearizado correspondiente. El número de copias por microlitro de los estándares se calculó como: [ADN] estándar ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) \* constante de Avogadro \*  $\text{ng}^{-1}$  ADN plasmídico.

### 2.3.4 - Optimización de los ensayos de qPCR

Partiendo de las condiciones establecidas para la PCR convencional de cada gen, se optimizaron los ensayos de qPCR con el fin de obtener una alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad en los mismos. Se evaluó la concentración de cada par de *primers*, la cantidad de ADN por reacción, el agregado de mejoradores de la reacción (*e.g.*, dimetilsulfóxido o DMSO) y los parámetros del programa de amplificación. Las condiciones finales para cada ensayo se muestran en el Cuadro 14.

Para el ensayo de metanótrofos de tipo I fue necesario realizar la lectura de fluorescencia a mayor temperatura, ya que no pudo evitarse la formación de dímeros de *primers* (Cuadro 14). La reacción también se optimizó con agregado de DMSO 2,5%.

### 2.3.5 - Cuantificación de genes por qPCR

La cuantificación de las muestras se realizó en un termociclador Mx3000P qPCR (Agilent Technologies) para el gen *pmoA* y los metanótrofos de tipo II, y en un Applied Biosystems® 7500 para los metanótrofos de tipo I. En todos los casos se utilizó la mix

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) de Roche y un volumen final de reacción de 15  $\mu$ l, en las condiciones especificadas en el Cuadro 14. Las muestras, curva estándar y negativos, se analizaron por triplicado en cada microplaca de PCR. La calidad del producto amplificado se chequeó a través del análisis de las curvas de disociación y en geles de agarosa 1% revelados con SYBR® Safe. Se obtuvieron datos de n° copias reacción<sup>-1</sup> a través de una curva estándar de log (n° copias) en función del Ct (*Cycle threshold*: n° de ciclos requeridos para que la fluorescencia supere el nivel umbral). El R<sup>2</sup> o bondad de ajuste se mantuvo en valores entre 0,988 y 0,994, mientras que la eficiencia estuvo dentro del rango 93,5-110%.

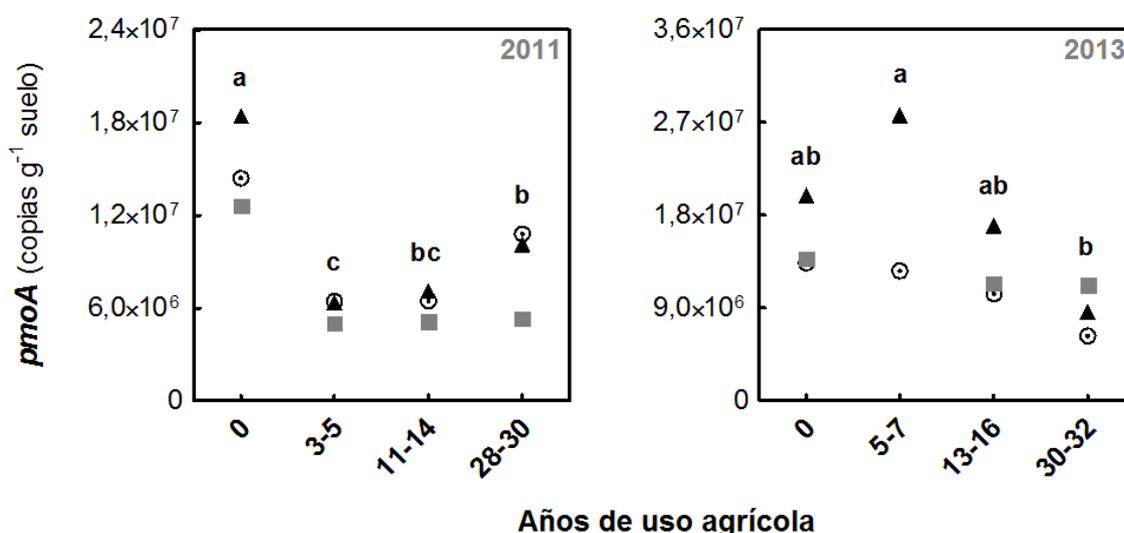
#### **2.4 - Análisis estadístico**

La abundancia de genes se expresó como n° copias g<sup>-1</sup> suelo, luego de corregir por la cantidad de ADN extraído, y adicionalmente se calculó la relación entre metanótrofos de tipo I y II. El análisis estadístico fue análogo al utilizado en el Capítulo 2, previo análisis de normalidad, homocedasticidad y outliers. Dentro de cada cronosecuencia (2011 y 2013), el número de copias de cada gen para los distintos sitios (*i.e.*: categorías de años bajo uso agrícola) se comparó utilizando modelos mixtos lineales generalizados con el paquete ‘nlme’ (Pinheiro *et al.*, 2015). La variable categórica «años de uso» se trató como efecto fijo, mientras que el factor «finca» se consideró como efecto aleatorio. Estos modelos se utilizaron para realizar análisis de varianza y test de comparaciones múltiples de Tukey (paquete ‘multcomp’ - Hothorn *et al.*, 2008). Por último, los datos de cuantificación de los distintos grupos se cotejaron con las variables físico-químicas presentadas en el Capítulo 2 a través de análisis de correlación y análisis multivariados.

### 3 - Resultados

#### 3.1 - Abundancia de bacterias metanótrofas

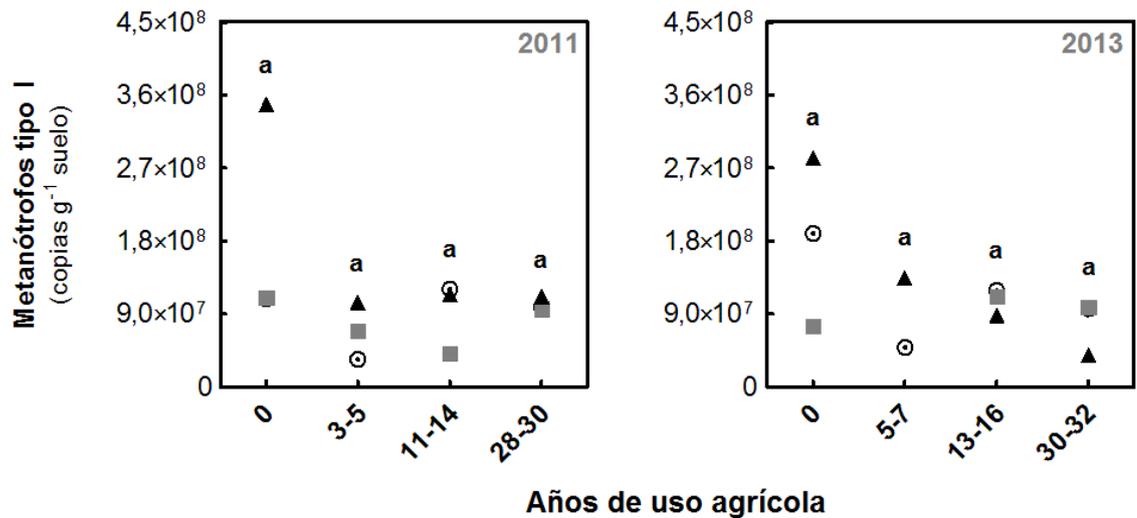
En el año 2011, se encontró un mayor n° de copias del gen *pmoA* (metanótrofos totales) en el suelo de monte que en los suelos agrícolas (Figura 22). También se observaron variaciones en la cronosecuencia, con un incremento en los suelos de 28-30 años, el cual parece estar explicado por dos de las fincas. En 2013 no se observó esa caída dada por el uso agrícola pero sí una tendencia a menor abundancia de metanótrofos en los suelos con larga historia de uso agrícola (Figura 22). Este patrón decreciente, significativo entre suelos de 5-7 años y de 30-32 años de uso agrícola, fue contrario a lo observado en 2011. El número de copias de *pmoA* en suelos de monte se mantuvo en un rango similar de valores entre ambos años, pero en suelos agrícolas abarcó mayores valores en 2013.



**Figura 22.** Abundancia del gen funcional *pmoA* (metanótrofos totales) en suelos de una cronosecuencia agrícola muestreados en 2011 (izq.) y 2013 (der.). Los símbolos representan las diferentes fincas (■ IS, ● PC y ▲ LR) y las letras señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

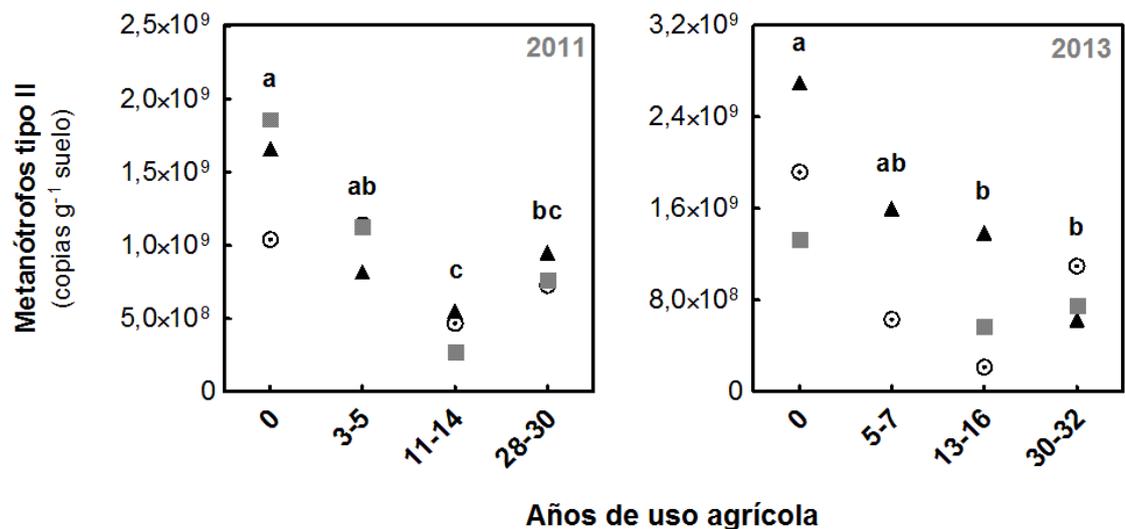
#### 3.2 - Bacterias metanótrofas de tipo I y de tipo II

El número de copias de los genes marcadores taxonómicos de metanótrofos de tipo I y de tipo II (gen 16S rRNA de metanótrofos pertenecientes a *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, respectivamente) fue entre uno y dos órdenes de magnitud superior a los de *pmoA*. Según el análisis estadístico, los metanótrofos de tipo I no presentaron una variación clara en la cronosecuencia en ninguno de los años de muestreo (Figura 23). Sin embargo, este resultado pareciera no ser consistente entre fincas, ya que el suelo de monte de la finca LR en ambos años y de la finca IS en 2013, tendieron a presentar un mayor número de copias de tipo I. Los niveles de metanótrofos de tipo I registrados en ambos años fueron muy similares.

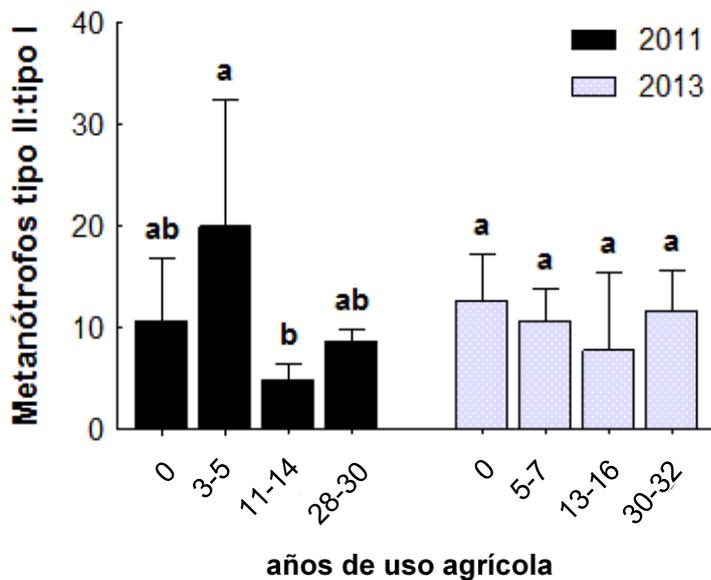


**Figura 23.** Abundancia de metanótrofos de tipo I (*Gammaproteobacteria*) en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados 2011 (izq.) y 2013 (der.). Los símbolos representan las diferentes fincas (■ IS, ● PC y ▲ LR) y las letras señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

Los metanótrofos de tipo II se comportaron de manera muy diferente a los de tipo I, con variaciones similares a las halladas para *pmoA*. En 2011 se observó una caída gradual del número de copias del gen 16S rRNA de metanótrofos tipo II entre los suelos de monte y los suelos con 11-14 años de cultivo, seguida de una tendencia a incrementarse nuevamente hacia los 28-30 años de historia agrícola (Figura 24). En 2013 la tendencia fue similar, con una caída gradual de los metanótrofos de tipo II, pero en este caso no se registró un aumento hacia los sitios de larga historia agrícola sino que sólo una de las fincas, PC, mostró esa tendencia (Figura 24). Este gen registró valores más altos en 2013 que en 2011.



**Figura 24.** Abundancia de metanótrofos de tipo II (*Alphaproteobacteria*) en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados en 2011 (izq.) y 2013 (der.). Los símbolos representan las diferentes fincas (■ IS, ● PC y ▲ LR) y las letras señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 25.** Relación entre metanótrofos de tipo II y tipo I en suelos de una cronosecuencia agrícola analizados en 2011 (barras negras) y 2013 (barras grises). Las barras representan el desvío estándar y las letras señalan diferencias significativas entre categorías de uso agrícola ( $\alpha=0,05$ ).

El cociente entre metanótrofos tipo II: tipo I registró valores entre 0,93-37,12. En 2011 este cociente tendió a ser superior en los suelos con 3-5 años de agricultura, aunque esas diferencias sólo fueron significativas en comparación con los sitios de 11-14 años (Figura 25). En el año 2013 no se encontró ningún patrón por uso de la tierra.

### 3.3 - Correlación con otras variables medidas

La correlación con variables microbiológicas sólo fue significativa en el caso de covariación en respuesta al uso agrícola (*e.g.*, *pmoA* y carbono de la biomasa microbiana), con lo cual no se amerita presentar los datos. De manera similar, cuando se analizaron las correlaciones entre los genes cuantificados y las variables físico-químicas del suelo, los resultados estuvieron determinados principalmente por los valores marcadamente diferentes de monte (*e.g.*, CO, C lábil, N total, C:N, amonio -año 2011- y CE) y no contribuían especialmente a la interpretación de los resultados (Cuadro S3). Por este motivo, se agregó un análisis sólo con los sitios agrícolas, donde nuevamente se observó relación principalmente con CO, C lábil y N total pero sólo para el gen *pmoA* (Cuadro S4). Al separar ambos muestreos se observó lo siguiente: en 2011, una relación positiva entre *pmoA* y arena (0,71,  $P=0,03$ ); en 2013, correlaciones positivas entre ese mismo gen y CO (0,77,  $P=0,02$ ), C lábil (0,85,  $P=0,01$ ) y N total (0,83,  $P=0,01$ ). Es decir, en primer lugar una asociación positiva con texturas gruesas y en 2013 con el contenido de carbono y nutrientes.

## 4 - Discusión

*pmoA* es un gen funcional que se utiliza como estimador de la abundancia de metanótrofos u oxidadores del metano. Los antecedentes muestran que la deforestación reduce el potencial de oxidación de metano del suelo y que estos cambios están asociados principalmente a cambios en la estructura del grupo funcional de los metanótrofos (Tate, 2015). No obstante, nuestros resultados evidencian también un cambio a nivel cuantitativo, principalmente en el muestreo 2011, en el cual se detectó una reducción en

el número de copias de *pmoA*. Este resultado coincide con trabajos realizados en la selva de Amazonas, en los cuales se encontró un mayor nº copias de *pmoA* en suelos prístinos o reforestados que en suelos aledaños cultivados (Lammel *et al.*, 2015a; b) o bajo sistema pastoril (Paula *et al.*, 2014). De manera similar, Zheng *et al.* (2010) hallaron un mayor número de copias de este gen en suelos donde se regeneró la vegetación nativa. La mayor abundancia de metanótrofos en suelos prístinos podría estar dada, principalmente, por su mayor fertilidad física, con una mayor porosidad, y el mayor contenido de materia orgánica, que no sólo contribuye a la estructura, sino que también está asociada a la oferta de carbono y nutrientes para los microorganismos (Tate, 2015). El contenido de N y de amonio también fue superior en el monte, pero su efecto en los metanótrofos del suelo ha mostrado ser ambiguo, quizás por diferencias en las comunidades metanotróficas o en las dosis de nitrógeno evaluadas (Ho *et al.*, 2013; Tate, 2015). En suelos agrícolas no encontramos correlación entre la abundancia de *pmoA* y el contenido de N total o de amonio, con lo cual el nitrógeno no parece ser un factor determinante en la mayor abundancia de *pmoA* del monte.

Los metanótrofos utilizan el metano como fuente de carbono y energía, de lo cual se deduce que en los suelos prístinos hay niveles suficientes de metanogénesis como para sostener esta demanda (aunque una buena proporción de estos metanótrofos puede estar en estado de reposo). Siguiendo este razonamiento también se podría esperar que si los suelos agrícolas presentan menor aireación y esto a su vez induce mayores niveles de actividad anaeróbica, como la metanogénesis, una potencial mayor disponibilidad de metano podría compensar el perjuicio sobre los metanótrofos. Por esta razón este Capítulo se había propuesto inicialmente cuantificar arqueobacterias metanogénicas, un objetivo que no se cumplimentó debido a las dificultades para cuantificar específicamente el gen marcador *mcrA* (que en muestras de suelo se encuentra en niveles muy bajos) y, luego, inconvenientes técnicos con el equipo de qPCR. A futuro se propone estudiar la dinámica de este grupo funcional en la cronosecuencia y su posible relación con los procesos de densificación del suelo, como la que reportaron otros autores (Frey *et al.*, 2011; Šibanc *et al.*, 2014; Lammel *et al.*, 2015a). Los metanógenos podrían funcionar incluso como indicadores tempranos de limitantes en la difusión de oxígeno, resultado de procesos de densificación del perfil como los que se registraron en los suelos de la zona (Rodolfo Gil, INTA, comunicación personal).

Durante el período agrícola de la cronosecuencia de 2011 (3-5 a 28-30 años de cultivo), se encontró un incremento en metanótrofos. Pese a que para otras variables la mayoría de los resultados apuntaban a que los suelos agrícolas eran muy similares, más allá de su antigüedad de uso, este resultado sugiere una reestructuración de la comunidad microbiana hacia la recuperación de este grupo funcional. Otras variables edáficas podrían estar afectando estos cambios: por ejemplo, los sitios de 28-30 años con mayor abundancia de *pmoA* fueron también los que presentaron texturas más gruesas (de hecho, se encontró una correlación positiva entre contenido de arena y *pmoA* al limitar el análisis a los sitios agrícolas de 2011). Esta relación podría estar dada por una mayor aireación del suelo, la cual favorecería el desarrollo de microorganismos aerobios estrictos como son la gran mayoría de los metanótrofos (Le Mer y Roger, 2001; Aronson *et al.*, 2013).

Las divergencias en los resultados entre muestreos en relación con la abundancia de *pmoA* deben ser interpretadas, al igual que en el Capítulo 2, en el marco de las tres variables que los diferencian: déficit hídrico, profundidad de muestreo y años de uso. En primer lugar, alguno de esos factores está suavizando la relación entre suelos prístinos y cultivados, ya que los suelos de monte sólo tendieron a superar a los de 30-32 años de cultivo. En este caso, la hipótesis más probable es que el déficit hídrico haya reducido diferencialmente

las poblaciones de este grupo funcional, afectando más a aquellas de suelos prístinos que a las de suelos agrícolas. De manera similar, en el trabajo de Lammel *et al.* (2015a) las diferencias dadas por el uso fueron más marcadas en la época húmeda. Sería esperable que las comunidades microbianas de suelos cultivados, dado el ambiente particular que habitan, estén más adaptadas a sobrellevar variaciones extremas en el contenido hídrico. En esta cronosecuencia parecen haberse favorecido los metanótrofos de tipo II, más adaptados al disturbio (Ho *et al.*, 2013). Por otro lado, debido a la distribución de los microorganismos en el perfil, la profundidad de muestreo definitivamente tendría influencia sobre la abundancia de distintos grupos funcionales. En base a esto, los valores obtenidos en 2013 estarían siendo sobreestimados, por haber sido tomados a menor profundidad. Aun así, en el suelo de monte los valores obtenidos en ambos años son similares (*i.e.*, fueron menos abundantes a pesar de estar más “concentrados” por gramo de suelo).

Las diferencias en contenido hídrico también pudieron haber suavizado el aumento que se detectó en 2011 para los suelos de larga historia agrícola, aunque aquí cobra relevancia también la profundidad de muestreo. Al haber excluido el horizonte densificado en 2013 (0-10 cm), ya que el muestreo fue justamente restringido por este motivo, la textura del suelo pudo haber sido menos determinante en la aireación del suelo. A la vez, a un contenido hídrico reducido, las posibles diferencias en porosidad serían menos evidentes en términos de aerobiosis/anaerobiosis. Esto último aplicaría también a las menores diferencias entre suelos de monte y agrícolas.

La clasificación en metanótrofos de tipo I y tipo II (*Gamma-* y *Alphaproteobacteria*, respectivamente) se creó a partir de metanótrofos cultivables, en parte por la congruencia entre la filogenia de los genes 16S rRNA y *pmoA*, pero también por el valor ecológico de la relación entre ambos grupos (Ho *et al.*, 2013). En este estudio, los metanótrofos de tipo II se mostraron más sensibles al cambio en el uso de la tierra que los de tipo I, con una menor abundancia en suelos agrícolas. A nivel global, los metanótrofos de tipo I (*Gammaproteobacteria*) no mostraron una respuesta consistente al cambio en el uso de la tierra. Considerando la similitud en la respuesta de metanótrofos de tipo II y *pmoA*, tanto en variaciones entre años como en la tendencia a incrementarse en los suelos con 28-30 años de cultivo, se podría inferir que el comportamiento de los metanótrofos responde principalmente a cambios en los de tipo II. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que con los *primers* comúnmente utilizados para cuantificar metanótrofos tipo II en base al gen 16S rRNA también se están cuantificando metanótrofos no convencionales, que no presentan el gen *pmoA*, como los del género *Sphingomonas* (Bodelier *et al.*, 2000). Este hecho, sumado a que dentro del grupo *Methylocystis-Methylosinus* de los metanótrofos tipo II se encontró una isoenzima de alta afinidad (pMMO2) (Ho *et al.*, 2013), explicaría también por qué el n° de copias del gen de este grupo fue superior al de *pmoA*. Esto último, también observado para metanótrofos de tipo I, podría ser explicado en parte por el n° de copias de cada gen que poseen las bacterias: mientras que en promedio en n° de copias de *pmoA* es de 2, el de 16S rRNA es mucho más variable, de 1 a 7 copias (Větrovský y Baldrian, 2013). Además, a pesar de tratarse de *primers* comúnmente utilizados, en el análisis de secuencia de los fragmentos amplificados en este estudio algunos de ellos resultaron específicos para el gen 16S rRNA de cada taxón (*Alpha-* o *Gammaproteobacteria*) pero no exclusivamente para secuencias de bacterias metanótrofas pertenecientes a esos grupos taxonómicos.

A pesar de que los metanótrofos de tipo II se vieron más afectados por el uso agrícola, estas diferencias relativas no llegaron a reflejarse en la relación tipo II:tipo I. Este resultado se contradice parcialmente con los antecedentes publicados, donde los suelos

prístinos o forestales parecieron estar dominados por metanótrofos de tipo II (*Alphaproteobacteria*), mientras que en los de pastura o agrícolas fueron dominantes los de tipo I (e.g., Singh *et al.*, 2007; Tate *et al.*, 2007; Dörr *et al.*, 2010). En nuestro caso los metanótrofos de tipo II también se vieron desfavorecidos por la deforestación, pero, en mayor o menor medida, siempre fueron más abundantes (tipo II: tipo I = 0,93-37,12), contrario a lo publicado por Zheng *et al.* (2010). Según Ho *et al.* (2013), los metanótrofos de tipo II suelen ser más abundantes que los de tipo I, aunque éstos suelen ser los más activos, mientras que los de tipo II se encuentran principalmente en estructuras de reposo (Krause *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016). Un factor a tener en cuenta es que los trabajos que encontraron mayor abundancia de metanótrofos de tipo I en suelos cultivados no fueron llevados a cabo con marcadores moleculares como en nuestro caso, sino que se realizaron con la técnica de PLFA (*Phospholipid Fatty Acids*), identificando ácidos grasos específicos de ambos grupos pero limitándose a la comunidad microbiana viable. Si los metanótrofos de tipo II se encuentran principalmente en estado durmiente (Krause *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2016) y el contenido de PLFA en células durmientes es menor que en células activas (Blagodatskaya y Kuzyakov, 2013), en esos trabajos podría estar subestimándose la abundancia de este grupo. Lamentablemente, los ácidos grasos marcadores de esos grupos no pudieron ser identificados con metodología utilizada en el Capítulo 3, con lo cual no es posible determinar la magnitud del sesgo entre ambas técnicas.

Un resultado a destacar es que, el cociente tipo II:tipo I tendió a presentar una mayor abundancia en suelos de 3-5 años de cultivo de la cronosecuencia 2011. Ese incremento relativo de los metanótrofos de tipo II podría ser resultado de su estrategia de vida, si se tiene en cuenta que los ambientes de 3-5 años son los que parecen ser más afectados por el desmonte relativamente reciente (Capítulos 2, 3 y 5). A diferencia de los metanótrofos de tipo I, que se destacan por ser más activos y responder rápidamente a la disponibilidad de metano (“competidores ruderales”), los de tipo II parecen constituir una población relativamente estable, en estado durmiente, con una estrategia de tipo “tolerantes a estrés” (Ho *et al.*, 2013, 2016). De acuerdo con estos autores, los de tipo II predominarían luego de un disturbio o condiciones cambiantes. Esa mayor resiliencia respondería a que pueden formar estructuras de reposo, junto con otras estrategias que les permiten soportar condiciones adversas por largos períodos y recuperarse rápidamente una vez restablecidas las condiciones. La técnica utilizada (*i.e.*, qPCR de ADN) cuantifica también a los metanótrofos tipo II en formas de reposo, que, como ya se mencionó es la forma predominante en la que los metanótrofos de tipo II están en el suelo.

De cualquier modo, la relación entre la estrategia de vida de ambos grupos de metanótrofos y el uso de la tierra no es tan directa, ya que los metanótrofos de tipo I no mostraron una caída consistente en la cronosecuencia que sustente su mayor sensibilidad al disturbio. Lo que sí se observó fue que la caída en los de tipo II fue detectable recién en los suelos de historia agrícola media. Arriesgando una explicación a lo observado, podría ser que este grupo haya tolerado relativamente bien el disturbio dado por el cambio en el uso de la tierra y que, con los sucesivos años de uso agrícola, donde se adaptan mejor los microorganismos de tipo estrategias *r*, hayan reducido su abundancia. Esclarecer este fenómeno sería muy interesante para relacionar aspectos ecológicos de la comunidad metanotrófica con los cambios asociados al desmonte y en el cambio en el uso de la tierra. Para ello, a futuro podrían realizarse estudios que analicen estos grupos a partir de otro gen, como el *pmoA* (Ho *et al.*, 2016), para evitar posibles problemas de especificidad asociados a la amplificación gen 16S rRNA, tal como se discutió anteriormente.

## 5 - Conclusiones

Este estudio permitió estimar la abundancia de metanótrofos a partir de la cuantificación del gen *pmoA* y evidenciar un efecto negativo del cambio en el uso de la tierra en muestras de 2011 y del tiempo bajo uso agrícola en 2013. En muestras de 2011, el resultado hallado condice con los cambios drásticos encontrados al inicio de la cronosecuencia para otras variables. Por otro lado, se pudieron observar cambios a nivel estructural dados por la proporción de metanótrofos de tipo I y tipo II, pero el gen 16S rRNA presentó algunas limitaciones. Los metanótrofos de tipo II parecen verse afectados por el ambiente agrícola pero no al punto de revertir la relación tipo II:tipo I. Por otro lado, los resultados también sugieren que los metanótrofos de tipo II presentarían cierta tolerancia a los disturbios asociados al cambio en el uso de la tierra. Futuros estudios sobre la estructura de este grupo funcional y estos dos grupos podrían esclarecer la relación entre la adaptación ecológica de distintos metanótrofos con la respuesta de este grupo funcional al uso agrícola, idealmente relacionándolo con cambios en su función.

## **CAPÍTULO 5**

**ESTABILIDAD (RESISTENCIA Y RESILIENCIA) DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO ANTE UN EVENTO DE ESTRÉS HÍDRICO**



## 1 - Introducción

### 1.1 - Antecedentes y presentación del problema

En ecología microbiana, la estabilidad de las comunidades se entiende como la resistencia y resiliencia en su abundancia, estructura o función, ante un disturbio o evento estresante. Al igual que Schimel *et al.* (2007), aquí consideraremos estrés a todo aquel evento que derive en un desafío fisiológico para la comunidad microbiana y comprometa su función o supervivencia. En ese contexto, entonces la resistencia es la habilidad para soportar, o mantenerse inalterado, luego de dicho evento, mientras que la resiliencia se entiende como la capacidad de recuperación de la comunidad hasta un equilibrio igual o diferente del estado inicial. Pese a que autores como Griffiths y Philippot (2012) han clasificado a este último concepto de ingenieril más que ecológico, resulta más sencillo de encarar experimentalmente y es por eso el más utilizado.

Los estudios de respuesta al estrés son mucho menos frecuentes en ecología microbiana que en ecología vegetal, a pesar del gran impacto que tienen los microorganismos en el funcionamiento de un ecosistema (Schimel *et al.*, 2007). Constituyen estudios particularmente interesantes porque podrían detectar diferencias entre comunidades microbianas de distintos suelos que no saldrían a la luz midiendo puntualmente una o varias variables de actividad o estructura (Griffiths *et al.*, 2000). De esta forma, la estabilidad constituiría una herramienta más interpretativa, aportando un enfoque más dinámico a los estudios de ecología microbiana de suelos (Griffiths y Philippot, 2012) y al diagnóstico de la salud del suelo (van Bruggen y Semenov, 2000). Por otro lado, esta estrategia podría contribuir al entendimiento de la relación existente entre estructura (abundancia y diversidad) y función, al realizar un seguimiento de cómo evolucionan ambos aspectos ante una modificación del entorno (Deng, 2012). Realizando estudios en microcosmos es posible enfocarse en un estrés relevante para los suelos bajo estudio, como es en el caso de los suelos del NOA el estrés hídrico y los procesos asociados al secado-rehumedecimiento del suelo. Ambos están entre los eventos más frecuentemente estudiados, junto con las temperaturas extremas y los disturbios químicos, particularmente la presencia de xenobióticos (Griffiths y Philippot, 2012).

En los últimos diez o quince años se incrementó marcadamente la cantidad de estudios de este tipo, en su mayoría experimentos en microcosmos con especial foco en la resistencia y resiliencia de aspectos funcionales (Griffiths y Philippot, 2012). Muchos autores comparan diferentes intensidades de estrés o disturbio (Banning y Murphy, 2008; Bérard *et al.*, 2011) o la estabilidad que tienen suelos bajo diferente historia de manejo (Kuan *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2008; Hueso *et al.*, 2011). No obstante, son menos los que han comparado suelos bajo diferentes usos (Degens *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 2001), y en particular suelos cultivados y prístinos (Chaer *et al.*, 2009a). Los resultados de estos estudios muestran que las variables medidas, ya sean de función o estructura, presentan una resistencia variable (*e.g.*: Banning y Murphy, 2008; Gordon *et al.*, 2008). Algo similar se observó para la capacidad de recuperación; mientras que, en algunos estudios, variables como biomasa y actividad enzimática se restablecieron luego de un tiempo (Hueso *et al.*, 2011), en otros las comunidades sufrieron un cambio irreversible en su estructura (Bérard *et al.*, 2011) o en su biomasa (Banning y Murphy, 2008). Según Griffiths y Philippot (2012), la diversidad de resultados es consecuencia de que la expresión de la estabilidad es un proceso complejo, resultado de la interacción de las comunidades microbianas con las propiedades del suelo y la vegetación. Según estos autores, esta complejidad la convierte en una herramienta útil para obtener un diagnóstico integrado del estado de salud de un suelo en particular.

## 1.2 - Justificación

La realización de un ensayo en microcosmos surgió de la necesidad de aportar un enfoque dinámico al estudio de las comunidades microbianas de estos suelos. En los tres capítulos anteriores, la dinámica de trabajo consistió en la toma de muestras a campo, donde los tratamientos estaban dados por los diferentes ambientes, y el análisis *in vitro* de una serie de variables. Ese tipo de enfoque es útil para comparar entre los distintos tratamientos, pero la limitante es que se obtiene una única medición, puntual, y por ende sujeta a todos los condicionamientos de ese momento.

Los estudios de estrés en microcosmos aumentaron notablemente en los últimos años, precisamente por los motivos antedichos, pero aun así son escasos los trabajos que utilizan este enfoque en un escenario de cambio en el uso de la tierra. De hecho, el único antecedente publicado en el que se someten suelos prístinos y cultivados a estrés, corresponde a un ensayo de estrés térmico (Chaer *et al.*, 2009a) y no de estrés hídrico, como en este caso.

Los ensayos se realizaron con suelos de una de las fincas (“La Reina” o LR) pertenecientes a la cronosecuencia estudiada en el Capítulo 2, tanto del año 2011 como de 2013, con algunas variables agregadas en este año. Se evaluó la estabilidad ante un evento de estrés hídrico severo, emulando las sequías estivales que se producen en la zona. Pese a que el clima de la región es subtropical con estación seca en invierno, cada cierta cantidad de años se dan veranos secos que derivan en largos períodos de sequía. Asimismo, este ensayo permitió inquirir en un fenómeno observado en el Capítulo 2, donde la respiración microbiana se comportó de manera muy diferente entre los dos muestreos: mientras que en el de 2011 fue superior en los suelos de corta historia agrícola, en el muestreo de 2013, donde los suelos se encontraban en condiciones de déficit hídrico severo al momento del muestreo, los mayores valores de respiración se registraron en el suelo prístino.

Se escogieron variables microbianas que permitieran caracterizar aspectos estructurales y funcionales, algunas de ellas iguales o equivalentes a las estudiadas en otros capítulos (biomasa microbiana, perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos y respiración basal). Asimismo, a las variables funcionales se les sumó la respiración inducida por dos sustratos de diferente complejidad: glucosa, lábil y de rápida utilización, y ácido vanílico, más recalcitrante. Este último ácido orgánico es un monómero aromático producto de degradación de la lignina (Pyle, 2012) que puede encontrarse también en la materia orgánica estable del suelo (Burgess *et al.*, 1964). Estas determinaciones fueron optimizadas junto con miembros del grupo de trabajo en ensayos preliminares, y esos resultados fueron presentados en la IV CONEBIOS (Ortiz *et al.*, 2015).

## 1.3 - Objetivo

A través de ensayos manipulativos en microcosmos, evaluar la estabilidad (resistencia y resiliencia) de aspectos estructurales y funcionales de las comunidades microbianas del suelo luego de un evento de estrés hídrico severo, comparando ambientes pertenecientes a una finca de la cronosecuencia agrícola descrita en el Capítulo 2.

## 1.4 - Hipótesis y predicciones

Los eventos de estrés hídrico alteran la estructura y función de las CMS, y el impacto de este efecto está asociado a sus características y la de los suelos que habitan. Los suelos agrícolas, dada su mayor exposición a las condiciones atmosféricas y sus fluctuaciones,

que en la zona bajo estudio determinan estaciones húmedas y secas, albergan comunidades más adaptadas a eventos de estrés hídrico. Para algunas variables, la mayor biomasa y diversidad microbiana esperable en suelos prístinos podría compensar esta menor adaptación resultando en una mayor resistencia y/o capacidad de recuperación que las CMS cultivados.

*Predicciones: comunidades microbianas de suelos agrícolas presentarían mayor resistencia y capacidad de recuperación de su estructura (biomasa y composición) y funcionalidad ante la imposición de un evento de estrés hídrico. Comunidades de suelos prístinos presentarían mayor resistencia y/o capacidad de recuperación para algunas de las variables de estructura o función mencionadas.*

## **2 - Materiales y métodos**

### **2.1 - Descripción del área y muestreo**

Ver Capítulo 2.

### **2.2 - Muestras de suelo utilizadas**

Para los dos ensayos presentados en este capítulo se seleccionaron muestras de suelo pertenecientes a los dos momentos de muestreo (mayo 2011 y 2013). Debido a limitantes operativas asociadas al tipo de ensayo, principalmente de tipo logístico, debieron seleccionarse algunos de los ambientes estudiados en el Capítulo 2. Con este objetivo, en primer lugar, se seleccionó sólo una de las fincas; la elegida fue LR por haber mostrado sus CMS mayor respuesta al uso agrícola en términos generales. Dentro de ella se seleccionaron 3 sitios: pedemonte (prístino), agrícola de 5/7 años (corta historia o “agro-c”) y agrícola de 30/32 años (larga historia o “agro-l”). De este modo se redujo el número de muestras a analizar y los ensayos se enfocaron en los casos más contrastantes. Analizar los suelos de todas las fincas fue impracticable por razones de logística.

Debido a que el ensayo de 2011 fue preliminar, se utilizaron muestras compuestas de los 5 sub-sitios, que habían sido conservadas a -20°C porque debieron ser almacenadas durante más tiempo. Con las muestras de 2013 se realizó un diseño más completo, donde cada sitio estuvo representado por 3 de los 5 sub-sitios muestreados (aquellos que contaban con análisis físico-químicos) y se conservaron a 4°C porque el tiempo de almacenamiento fue menor. Para cada sub-sitio se confeccionaron tres microcosmos, que permitieron realizar las diferentes mediciones de manera desfasada.

### **2.3 - Diseño experimental**

Se realizaron dos ensayos por separado, uno para cada año de muestreo. El primer ensayo, con muestras de 2011, fue de carácter preliminar, y es por eso que el muestreo de 2013 presenta mayor número de réplicas analizadas (sub-sitios por separado) y dos variables más que el de 2011.

En ambos casos los microcosmos consistieron en muestras de suelo de 100 g (equivalente en peso seco) contenidas en bandejas de polipropileno de 178 x 132 x 50 mm, con tapa. Previo a cada ensayo, los suelos pasaron por un período de pre-incubación de 10/14 días (para 2011 y 2013, respectivamente), que se realizó con un contenido de humedad al 60% de la capacidad de campo (CC), a 25°C y en oscuridad (Figura 26). Durante el período de ensayo, y con el objeto de emular las condiciones del suelo durante el verano, todos los



Las diferencias en el tiempo de incubación respondieron en parte a limitaciones logísticas en la planificación de los ensayos y a que, en ese marco, se optó por aumentar en ~40% la duración de la pre-incubación y el estrés hídrico en el ensayo 2013 debido a que esas muestras provenían de una situación de déficit hídrico a campo (ver Capítulo 2).

## 2.4 - Determinaciones realizadas

En todas las muestras se determinó el contenido gravimétrico de agua en capacidad de campo con membrana de Richards (Laboratorio de Terramecánica e Implantación, Instituto de Ingeniería Rural, INTA) y se afectó ese valor por el porcentaje correspondiente para obtener 60% CC. El contenido de humedad se mantuvo de forma gravimétrica, teniendo en cuenta la cantidad (g) de agua correspondiente a la cantidad de suelo presente en el microcosmos a cada momento.

Para evaluar el efecto del estrés sobre la estructura de las comunidades microbianas se determinó la biomasa microbiana molecular (BMm) y el contenido y perfiles de ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFA). La funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo se estudió a través de la respiración basal y la respiración inducida por sustrato (glucosa y ácido vanílico). Dos de estas determinaciones, PLFA y respiración inducida por ácido vanílico, no fueron realizadas en el ensayo preliminar con muestras de 2011.

Las determinaciones se llevaron a cabo en cada una de las instancias de medición, inmediatamente de finalizada cada etapa. Las únicas excepciones fueron la biomasa microbiana y PLFA, cuyas metodologías permitieron almacenar las muestras a -80°C y -50°C, respectivamente, hasta su análisis. Por último, es preciso aclarar que, por cuestiones de estandarización, las determinaciones de respiración se llevaron a cabo a un contenido hídrico constante y equivalente al 60% CC, para lo cual, en el caso de muestras post-estrés, se rehumedeció el suelo inmediatamente antes de la incubación.

### 2.4.1 - Variables estructurales

#### 2.4.1.1 - Biomasa microbiana molecular

La biomasa microbiana molecular (BMm) se determinó como contenido de ADN total en las muestras de suelo (Petric *et al.*, 2011). Esta metodología de extracción directa de ADN a partir de muestras de suelo, que involucra la lisis química y mecánica de las células microbianas, fue publicada en la ISO-standard 11063:2012 y ha sido satisfactoriamente utilizado como estimador de la biomasa microbiana (Dequiedt *et al.*, 2011; Terrat *et al.*, 2012). Con esta metodología, de tipo *high-throughput*, se reemplazó la técnica de CBM utilizada en el Capítulo 2, la cual insume gran cantidad de tiempo y de muestra.

Para las extracciones se utilizaron 250 mg de suelo (equivalente en peso seco) y el protocolo descrito por Petric *et al.* (2011). Brevemente, para cada réplica se colocó el suelo en un microtubo conteniendo bolitas de vidrio de dos tamaños (0,5 g de 1 mm Ø y 0,5 g de 0,4-0,6 mm Ø), se le agregó 1 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8), EDTA 100 mM (pH 8), NaCl 100 mM, SDS 2% y polivinilpirrolidona o PVP 2%, y se agitó 20 min a máxima velocidad en un agitador tipo vórtex (Vortex-Genie® 2, MO BIO). Luego, se incubó durante 30 min a 70°C y se centrifugó a 14.000 g durante 1 min. El sobrenadante obtenido se mezcló con 1/10 vol de NaAcO 3M pH 5,2 y se incubó en hielo durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4°C y se precipitó el ADN agregando 1 vol. de isopropanol frío al sobrenadante. Finalmente, se centrifugó a 14.000 g durante 20 min a 4°C y el *pellet* obtenido se lavó con etanol 70° para luego ser resuspendido en 20 ó 30 µl de agua milliQ estéril.

El ADN extraído se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con SYBR® Safe, usando un estándar de calibración de ADN (Thermo Scientific™ Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker) y el software *GelAnalyzer* versión 2010. En cada gel se sembró el estándar por cuadruplicado, en distintas cantidades, y las muestras por duplicado o triplicado (muestras período rt, para reducir el error asociado al bajo rendimiento de ADN). La concentración de ADN ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) se calculó como un promedio de lo obtenido con las cuatro curvas de calibración y luego se expresó por g de suelo. En el caso de muestras con valores poco consistentes, se procedió a repetir la extracción y cuantificación.

#### **2.4.1.2 - Ácidos grasos de los fosfolípidos**

El proceso de obtención de los ácidos grasos de los fosfolípidos y su análisis por cromatografía gaseosa se realizó tal como se detalla en el Capítulo 3. En este ensayo las extracciones de PLFA se realizaron sobre muestras compuestas de los sub-sitios obtenidas en el año 2013. La determinación inicial de PLFA no se incluyó en el capítulo debido a que las determinaciones se habían realizado sobre suelos en la condición “de campo”, sin pre-incubación, y no fueron comparables con el resto de las mediciones.

Los datos obtenidos se analizaron principalmente como perfiles de PLFA, pero también se calculó la biomasa viable y los marcadores taxonómicos y de *status* metabólico estudiados en el Capítulo 3, así como los ácidos grasos agrupados por estructura química.

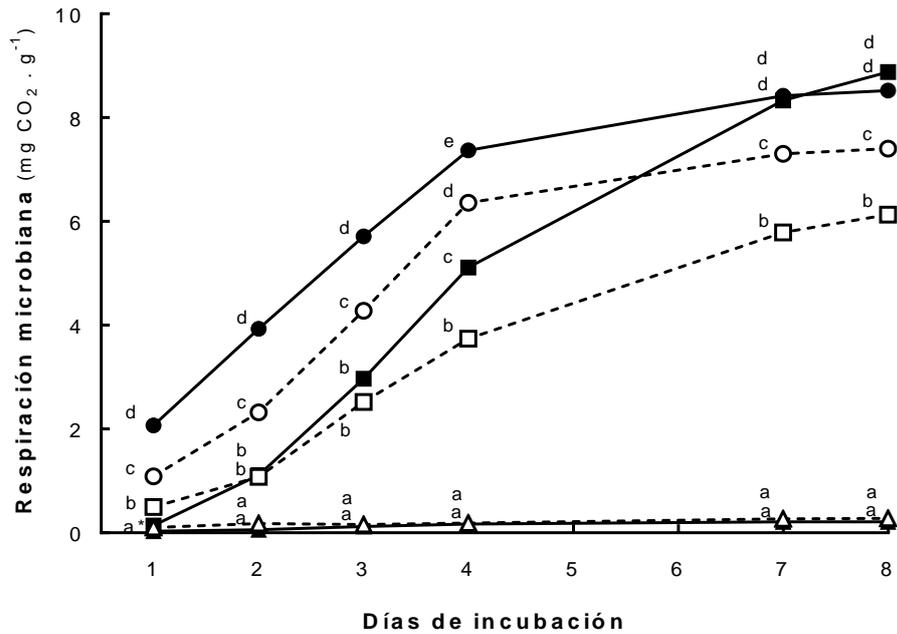
#### **2.4.2 - Variables funcionales**

##### **2.4.2.1 - Respiración basal**

La respiración basal (RB) microbiana se determinó de acuerdo a la metodología detallada en el Capítulo 2 (ISO-*standard* 16702:2002; Alef, 1995a), con la variante de utilizar 10 g de suelo en lugar de 25 g.

##### **2.4.2.2 - Respiración inducida por sustrato**

En las muestras de 2011 se midió la respiración inducida por glucosa, mientras que en muestras de 2013 se midió la respiración inducida por glucosa y por ácido vanílico o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (SIR-glu y SIR-van, respectivamente). En todas las determinaciones de SIR, los sustratos se agregaron inmediatamente antes de la incubación, en una matriz sólida caolín:sustrato (3:1) a razón de  $40 \text{ mg g}^{-1}$  suelo seco ( $4$  y  $4,68 \text{ mg C-sustrato g}^{-1}$  suelo seco para glucosa y ácido vanílico, respectivamente). La cantidad de fuente carbonada agregada se basó en la literatura (Alef, 1995a; Degens y Harris, 1997; Lin y Brookes, 1999) y en ensayos de prueba. Las incubaciones se realizaron en las mismas condiciones que para RB y en ensayos preliminares se detectó que las diferencias en utilización de diferentes sustratos eran evidentes a partir de las 72 h (Figura 27), con lo cual ese fue el tiempo de incubación elegido. En las muestras de 2011 se realizó una determinación adicional de SIR a las 24 h. Dada la mayor actividad respiratoria con el agregado de sustratos, las trampas para  $\text{CO}_2$  de SIR fueron de 25 ml de NaOH 0,5M y se titularon con HCl de la misma molaridad. La SIR ( $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$  suelo  $\text{h}^{-1}$ ) se calculó con una fórmula análoga a la de RB.



**Figura 27.** Datos de un ensayo preliminar mostrando la evolución de la respiración microbiana acumulada ( $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1}$ ) en un suelo agrícola (símbolos blancos) y un suelo prístino (símbolos negros). Se presentan datos de respiración basal ( $\triangle/\blacktriangle$ ), con agregado de glucosa ( $\circ/\bullet$ ) y con agregado de ácido vanílicico ( $\square/\blacksquare$ ). Letras diferentes señalan diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de medición ( $\alpha=0,05$ ). (Adaptado de Ortiz *et al.*, 2015)

## 2.5 - Análisis de los datos

### 2.5.1 - Exposición de los resultados

Los datos se expresaron en valores absolutos y también en relación a los tratamientos control, de acuerdo a la expresión:  $\text{Variación relativa (\%)} = (C_i - E_i) * C_i^{-1} * 100$ , donde:  $E_i$  = valor de la variable para el subsitio- $i$  expuesto a estrés hídrico, y  $C_i$  = valor de la variable para la el subsitio- $i$  control. Además de las variables medidas, se calculó la respiración específica ( $RE = RB * BMm^{-1}$ ), como extensión del cociente metabólico o  $q\text{CO}_2$  que se utiliza frecuentemente para relativizar la actividad a la biomasa microbiana.

### 2.5.2 - Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis que permitiera comparar el tratamiento de estrés con el control teniendo en cuenta las otras variables en juego. Con las muestras de 2011 se realizó un análisis para cada tiempo de medición (subsets para  $rt$ ,  $rl\text{-}cp$  y  $rl\text{-}lp$ ) utilizando la función  $gls$  (paquete 'nlme'), debido a que la cantidad de réplicas no era suficiente para incluir los tres factores y su interacción, tal como se realizó en el ensayo de 2013. En 2013 se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados con la función  $lme$  (paquete 'nlme') cuyo componente fijo fue 'ambiente\*estrés\*tiempo'. En el componente aleatorio se incluyó el factor 'microcosmos', de manera de considerar el efecto propio de cada bandeja. En este análisis se excluyó la determinación inicial para evitar efectos confundidos de tiempo y de estrés en el primer período (inicial- $rt$ ).

Por otra parte, se decidió realizar un segundo análisis que evaluara la variación de microcosmos control y estresados durante todo el ensayo. La necesidad de este análisis surgió luego de observar variaciones en las propiedades de los microcosmos control a lo largo de la incubación y a raíz de la complejidad de los resultados arrojados por el enfoque

anterior. Para evaluar este efecto tiempo\*ambiente se trabajó con los subsets de suelos estresados y control por separado, utilizando la función `gls`.

Todos los sets de datos y modelos fueron testeados por medio de herramientas gráficas para evaluar presencia de *outliers*, normalidad y homogeneidad de varianzas. En los modelos donde fuera necesario corregir posibles efectos debido a mediciones repetidas en el tiempo, se probaron distintas funciones de correlación (`corAR1`, `corARMA` y `corCompSymm`). Por otro lado, en el caso de modelos donde se detectó heterocedasticidad, se probó la función `varIdent` para modelar las varianzas en función de distintos factores del modelo (por ejemplo, 'ambiente'). Una vez planteados los distintos modelos para cada variable, se los comparó mediante AIC o criterio de información de Akaike (paquete 'bbmle'), que no sólo considera la bondad de ajuste sino también la complejidad del modelo. Finalmente, se testeó la validez del mejor modelo mediante herramientas gráficas, utilizando los residuales normalizados. En todos los casos, una vez seleccionado el modelo, se procedió a realizar análisis de varianza y comparaciones entre tratamientos con el paquete 'lsmeans'.

Los datos multivariados de PLFA se analizaron de manera análoga al Capítulo 3, con NMDS, one-way ANOSIM y, adicionalmente, *two-way* ANOSIM (distancia Bray-Curtis).

### 3 - Resultados

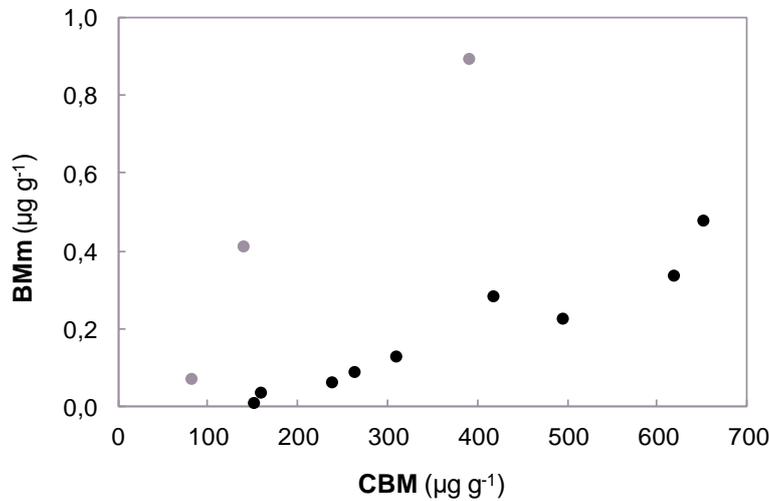
Se presentan las distintas variables en apartados separados, cada una con sus valores iniciales y la variación de ambos tratamientos (estrés y control) en el tiempo. Se escogió este modo de presentar los datos debido a que en los controles se modificaron los valores de las variables, haciendo que el análisis de estrés relativo al control no fuera válido para interpretar los resultados. De ser pertinente, se hace mención del análisis para la interacción ambiente\*tratamiento en cada tiempo (estrés *vs* control).

#### *Biomasa microbiana molecular*

La correlación entre la BMm y el CBM medido en el Capítulo 3 fue de 0,50 ( $P=0,10$ ) para los datos de 2011 y 2013, y de 0,96 ( $P<0,001$ ) cuando se consideraron sólo datos de 2013 (Figura 28). Esta correlación fue bastante alta aun cuando las determinaciones de CBM se hicieron en condiciones de humedad de campo y las de BMm luego de la pre-incubación a 60% CC. La BMm en muestras de 2011 fue aproximadamente la mitad de la registrada en 2013. A pesar de ello, la jerarquía entre ambientes fue similar: *monte>agro-c>agro-l* en 2011 y *monte>agrícolas* en 2013 (Cuadro 15). Estas relaciones entre ambientes se mantuvieron en las distintas instancias de medición, tanto en tratamientos control como estresados (Figura 29A y 29A).

En el ensayo de 2011, la BMm de los suelos de monte y de agro-c presentaron menor resistencia al estrés hídrico, con una reducción al tiempo  $r_t$  (Figura 29A) en comparación con el valor inicial. En agro-l no se observó una caída significativa respecto del valor inicial. Sin embargo, todos los ambientes presentaron niveles de BMm ~42-51% menores que los suelos control ( $P<0,001$ , Cuadro S5), los cuales prácticamente no se modificaron en ese período inicial y a su vez presentaron una variabilidad mucho menor. Luego de ser rehumedecidos, los suelos de monte y de agro-l recuperaron su BMm, la cual siguió aumentando hacia la medición final ( $r_{l-p}$ ), donde los niveles de BMm fueron superiores a los iniciales (Figura 29A). La recuperación comenzó con anterioridad en agro-l, según se observó en determinaciones adicionales realizadas luego de 24 y 72 h de rehumedecer los microcosmos (Figura S5). El suelo de agro-c, en cambio, no mostró resiliencia, ya que

su BMm comenzó a recuperarse más tarde, más lentamente y sin recuperar los valores iniciales en la duración del ensayo. Todos los suelos control incrementaron su BMm en el período rl-cp a rl-lp.



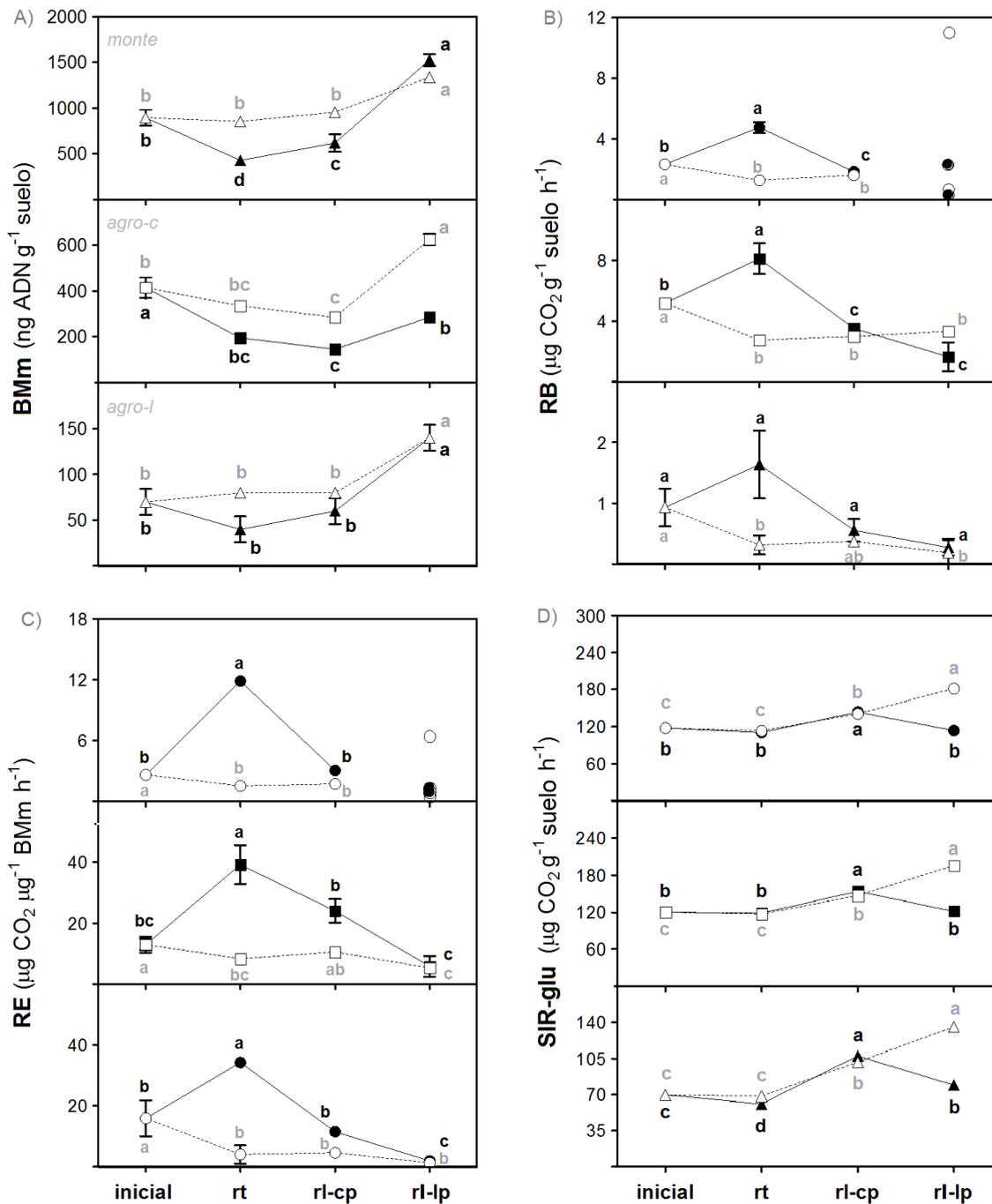
**Figura 28.** Relación entre el carbono de la biomasa microbiana (CBM) medido en el Capítulo 2 y las determinaciones iniciales de biomasa microbiana molecular (BMm) del ensayo de estrés. Se presentan datos promedio de muestras de 2011 (gris) y 2013 (negro).

En las muestras de 2013 la dinámica de esta variable fue algo diferente (Figura 30A). El único suelo que perdió BMm en respuesta al estrés fue el del monte, sugiriendo una mayor resistencia en los suelos agrícolas, que sólo presentaron una tendencia a la reducción. Al igual que en 2011, se observó un aumento de BMm posterior al estrés en los suelos de monte y agro-l, aunque éste ocurrió más temprano, entre rt y rl-cp. El sitio agro-c presentó una tendencia similar, pero con gran variabilidad en rl-cp. La recuperación más temprana de BMm en comparación con 2011 es reforzada por las determinaciones adicionales de esta variable, que mostraron que todos los suelos recuperaron su biomasa al cabo de 24 h. Los niveles de BMm en los suelos estresados se mantuvieron en el largo plazo, aunque presentaron una tendencia decreciente. Siguiendo lo observado en el ensayo 2011, los suelos control también incrementaron su BMm junto con los suelos estresados, pero presentaron una caída marcada en el último período, la cual determinó que en el monte el control fuera inferior al estrés (Figura 30A). Los suelos control de monte y agro-l llegaron al final del ensayo con una BMm inferior a los niveles iniciales.

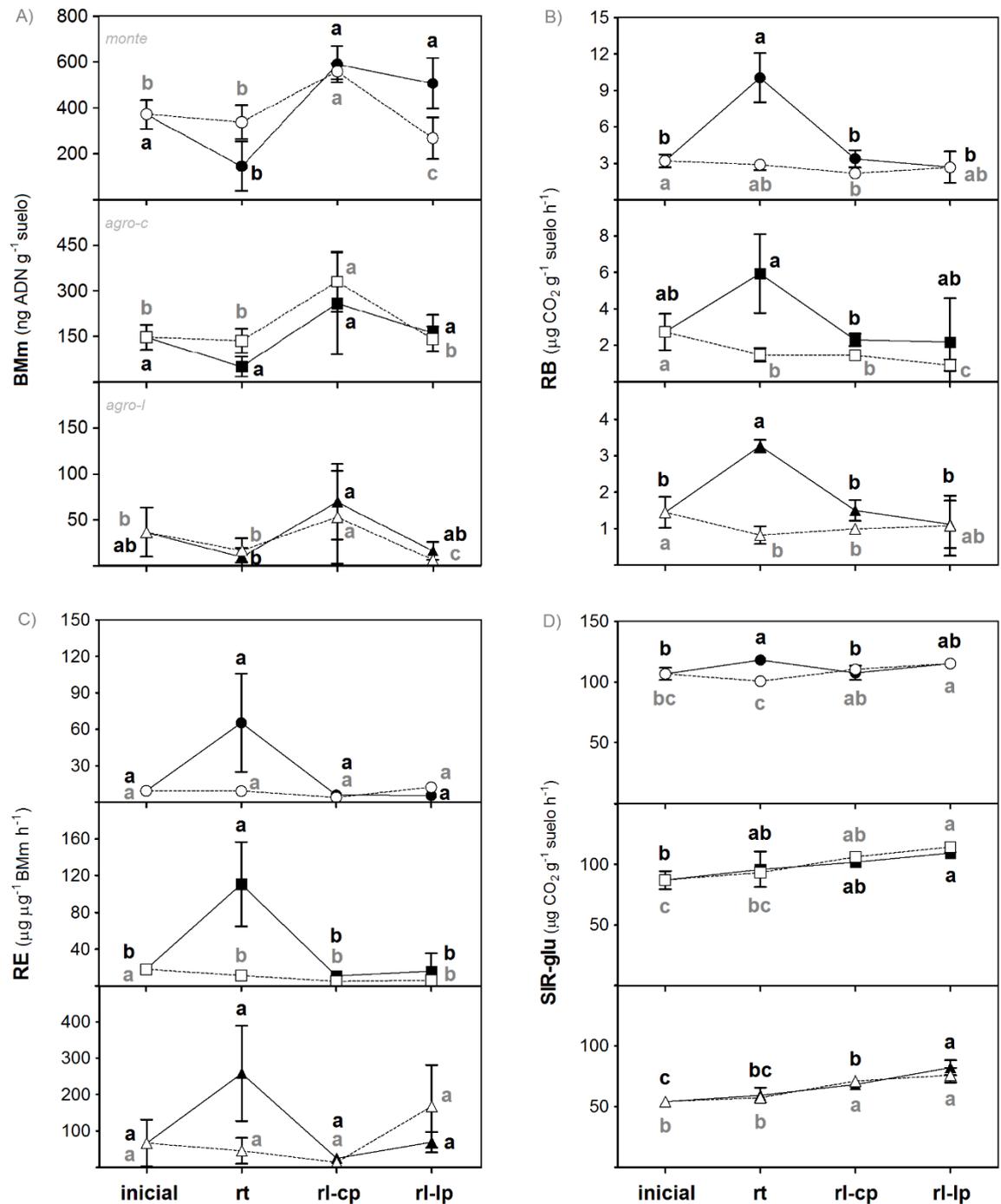
**Cuadro 15.** Valores de las variables medidas en la instancia inicial del ensayo de estrés para suelos de 2011 y 2013 pertenecientes a ambientes de monte y agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente).

		monte		agro-c		agro-l	
<b>BMm</b> (ng ADN g <sup>-1</sup> suelo)	2011	893±84	a	413±66	b	70±12	c
	2013	373±108	a	148±71	b	37±27	b*
<b>RB</b> (µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> suelo h <sup>-1</sup> )	2011	2,3±0,1	b	5,1±0,2	a	0,9±0,3	c
	2013	3,2±0,5	a	2,7±1,7	a	1,5±0,4	a
<b>RE</b> (RB:BMm)	2011	2,6±0,4	b	12,9±2,6	ab	15,9±5,9	a
	2013	9,3±3,7	a	18,0±4,5	a	66,8±64,6	a*
<b>SIR-glu</b> (µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> suelo h <sup>-1</sup> )	2011	118±0,0	a	121±2,9	a	69,7±2,5	b
	2013	106,7±5	a	87±12	a	54,3±4	b
<b>SIR-van</b> (µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> suelo h <sup>-1</sup> )	2013	137,3±3	a	118,7±17	a	70,3±9,5	b

\* La variabilidad está explicada por un sub-sitio con valores de biomasa sumamente bajos.  
Letras diferentes señalan diferencias significativas entre ambientes para cada año.



**Figura 29.** Evolución de variables microbianas en el ensayo de 2011 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). A) BMm: biomasa microbiana molecular, B) RB: respiración basal, C) RE: respiración específica y D) SIR-glu: respiración inducida por glucosa. Los tiempos de medición fueron: inicial, resistencia (rt), resiliencia de corto plazo (rl-cp) y de largo plazo (rl-lp). Las barras corresponden al desvío estándar y letras diferentes señalan diferencias significativas entre tiempos de medición para un mismo tratamiento ( $\alpha=0,05$ ).



**Figura 30.** Evolución de variables microbianas en el ensayo de estrés 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). A) BMm: biomasa microbiana molecular, B) RB: respiración basal, C) RE: respiración específica y D) SIR-glu: respiración inducida por glucosa. Los tiempos de medición fueron: inicial, resistencia (rt), resiliencia de corto plazo (rl-cp) y de largo plazo (rl-lp). Las barras corresponden al desvío estándar y letras diferentes señalan diferencias significativas entre tiempos de medición para un mismo tratamiento ( $\alpha=0,05$ ).

### *Respiración basal*

La RB no presentó la misma relación entre ambientes que la BMm. En 2011 la jerarquía fue *agro-c>monte>agro-l*, mientras que en 2013 no hubo diferencias entre ambientes sino una tendencia a mayor RB en el ambiente de monte (Cuadro 15). Esto no se modificó hasta rl-lp, donde en 2011 no se encontraron diferencias entre suelos estresados de distintos ambientes, y en 2013 no se diferenciaron los ambientes agrícolas (Figura 29B).

En 2011, el evento de estrés hídrico disparó un incremento de RB en los suelos de monte y de agro-c (Figura 29B). En agro-l, la variabilidad fue tal que no se observaron cambios en la RB promedio, aunque sí una tendencia al aumento. Los suelos control presentaron una disminución en ese período y eso derivó en que, en promedio, los suelos estresados los superaran en 268, 193 y 425% para los ambientes de monte, agro-c y agro-l, respectivamente (Cuadro S5). Los niveles de RB se recuperaron en el corto plazo, aunque en los suelos de monte y agro-l cayeron a valores menores a los iniciales. En el ambiente de monte, el análisis estadístico no incluyó rl-lp debido a una falla técnica en la determinación que derivó en valores poco confiables. Estos valores se presentan a modo ilustrativo.

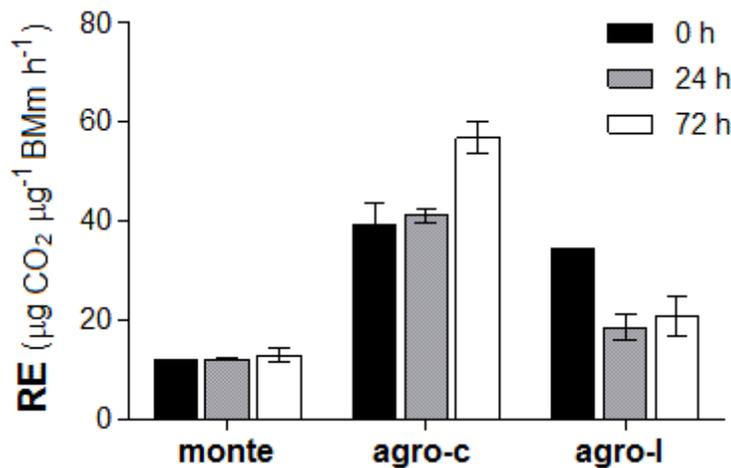
El ensayo de 2013 arrojó un patrón muy similar, con algunas diferencias puntuales (Figura 30B). En este caso el incremento respiratorio en respuesta al estrés hídrico fue muy notable en el suelo de monte y de agro-l, mientras que agro-c fue el que presentó gran variabilidad. Nuevamente, las diferencias con el control en rt fueron significativas en todos los ambientes (Cuadro S5) y su recuperación a niveles equivalentes a los iniciales (y a los controles) ocurrió en el corto plazo. En este ensayo, los suelos agrícolas, en especial el de corta historia, presentaron una alta variabilidad en rl-lp.

### *Respiración específica*

Al expresar la RB por unidad de biomasa, como un análogo al cociente metabólico  $qCO_2$ , se encontraron cambios tanto en la relación entre ambientes como entre años (Cuadro 15; Figuras 29C y 30C). En cuanto al primer aspecto, en 2011 la diferencia más notable fue que agro-l presentó la mayor RE promedio y superó al monte. En 2013 la jerarquía fue similar pero sólo una tendencia, ya que las determinaciones presentaron gran dispersión. En agro-l esa dispersión respondió a uno de los tres sub-sitios, en el cual se registraron niveles de biomasa microbiana muy bajos y, por ende, una RE muy elevada.

Al igual que RB, en ambos años y en todos los ambientes la RE presentó un incremento (o tendencia al incremento) luego del evento de estrés, el cual fue mucho más marcado en 2011 que en 2013 (en promedio, aprox. 5 veces comparado con 3 veces en 2011) (Figuras 29C y 30C). La diferencia también fue marcada al comparar suelos estresados y controles, incluso en 2013 (Cuadro S5), aunque en términos absolutos fueron los suelos agrícolas los que registraron mayor RE (Figura 29C). En el ensayo de 2013 la variabilidad detectada luego del tratamiento de estrés fue mucho mayor que en 2011, así como también fueron mucho mayores los valores registrados, en especial para agro-l (Figura 30C). Esa variabilidad, resultado de la dispersión entre sub-sitios, disipó las diferencias entre rt y la determinación inicial en el monte y en agro-l. La RE presentó una rápida recuperación del estrés hídrico, en particular en los suelos de monte, si se observan las diferencias con el control en rl-cp (Cuadro S5). Al final del ensayo no se encontraron diferencias entre suelos estresados y control. Algunos suelos terminaron el ensayo con una RE menor a la inicial: controles de agro-c en ambos años, control y estrés de agro-l en 2011. Además, los controles no evidenciaron una disminución en RE, salvo en el ambiente agrícola de corta, que varió levemente como en 2011.

Dado que la RE en rt se calculó con el valor de biomasa de suelos secos, mientras que la RB se estimó al 60% CC, se decidió calcular la RE en base a la BMm determinada a las 24 h y 72 h posteriores al rehumedecimiento (Figura 31). Al igual que para BMm, no hubo una recuperación temprana de RE. No obstante, los suelos agrícolas evidenciaron algunos cambios: mientras que en agro-c pareciera verse un aumento de RE en esas 72 h (reducción de biomasa), en agro-l parece haber una reducción en RE (aumento de biomasa). En contraste, al realizar el mismo cálculo para 2013, esa recuperación comenzó muy rápidamente: a las 24 h del rehumedecimiento la biomasa de todos los ambientes había aumentado lo suficiente como para reducir la RE en un 70% (datos no presentados).

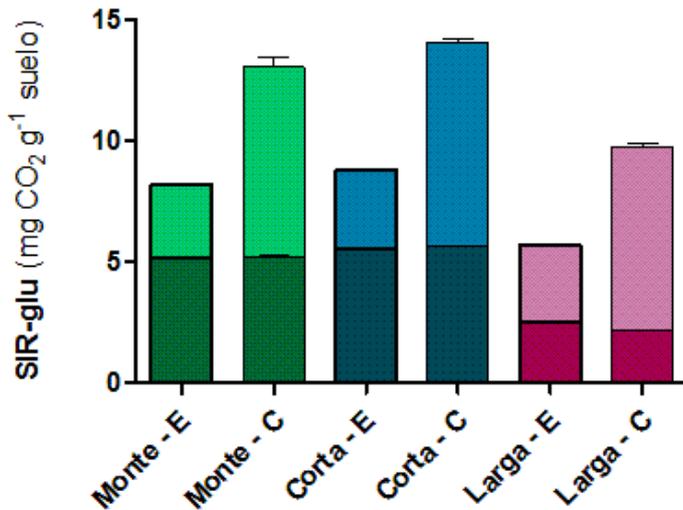


**Figura 31.** Respiración específica (RE) en suelos del ensayo 2011 al tiempo de resistencia o rt, calculada con la biomasa microbiana molecular (BMm) antes (0 h) y luego del re-humedecimiento (24/72 h). Las barras representan el error estándar.

#### *Respiración inducida por glucosa*

Al inicio de ambos ensayos SIR-glu presentó la jerarquía *monte=agro-c>agro-l* (Cuadro 15), que se mantuvo prácticamente en todo el ensayo, aunque el agrícola de corta historia tendió a asemejarse al suelo de monte (Figuras 29D y 30D).

SIR-glu presentó escasa respuesta al estrés hídrico en ambos ensayos y, en cada uno de ellos, el comportamiento entre ambientes fue similar. En 2011, SIR-glu resistió el estrés hídrico en el suelo de monte y en el agrícola de corta historia, sin variaciones con respecto al inicio o al control (Figura 29D). El ambiente agrícola de larga historia presentó una reducción leve, de ~10% con respecto al control, pero se recuperó en el corto plazo (Cuadro S5; Figura 29D). Hacia rl-cp, todos los suelos, estresados y control, presentaron un aumento en SIR-glu que superó los niveles registrados al inicio. Luego de ese incremento, todos los suelos estresados redujeron nuevamente su SIR-glu hasta niveles similares a los iniciales. Los controles, en cambio, sostuvieron ese aumento hasta el final de la incubación, finalizando el ensayo con una SIR-glu superior a la de los suelos estresados y a su condición inicial: ~100% superior en el ambiente de larga historia agrícola y ~50% en los otros dos ambientes (Figura 29D; Cuadro S5). Dado que la incubación de SIR-glu se había dividido en dos períodos (0-24 y 24-72 h), se pudo indagar más en las diferencias entre estrés y control observadas en rl-lp. En los tres ambientes, las diferencias en SIR-glu entre suelos estresados y control se hicieron evidentes en las últimas 48 horas de incubación, donde los suelos control emitieron el doble de CO<sub>2</sub> (Figura 32).



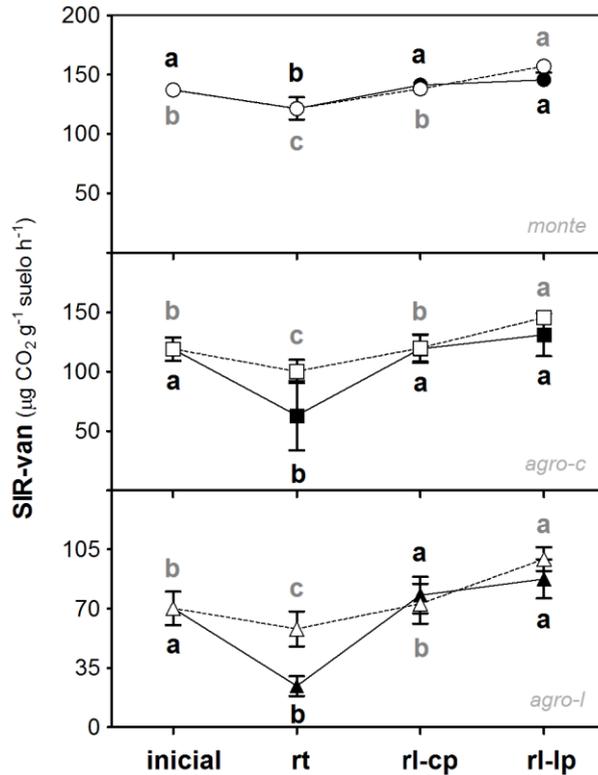
**Figura 32.** Respiración inducida por glucosa (SIR-glu) acumulada en dos períodos de la incubación: 0-24 h (tonos oscuros) y 24-72 h (tonos claros). Se presentan datos del ensayo 2011 al tiempo de resiliencia a largo plazo (rl-lp) para suelos estresados (E) y control (C) de los tres ambientes estudiados. Las barras representan el error estándar.

En el ensayo de 2013, SIR-glu también resistió al estrés hídrico en todos los ambientes, aunque el suelo de monte presentó un leve incremento que se reestableció en el corto plazo (Figura 30D; Cuadro S5). Los suelos agrícolas, en cambio, no se modificaron inmediatamente, pero mostraron un leve incremento en SIR-glu a lo largo de la incubación. Este incremento, al igual que en 2011, también se observó en los controles de todos los ambientes, con lo cual no hubo diferencias entre tratamientos al final del ensayo.

#### *Respiración inducida por ácido vanílico*

Las determinaciones iniciales de SIR-van (ensayo de 2013) arrojaron las mismas diferencias entre ambientes que SIR-glu, con la jerarquía *monte=agro-c>agro-l* (Cuadro 15). Esta relación entre ambientes se mantuvo a lo largo del ensayo en los controles, ya que todos se comportaron de manera similar (Figura 33). En la Figura 33 se observa que SIR-van resultó una función sensible al evento de estrés hídrico, al que respondió con una reducción al tiempo rt. La SIR-van de los ambientes agrícolas fue menos resistente que en el monte, en especial en el de larga historia de cultivo, donde la variabilidad de los datos medidos fue mucho menor. Los suelos agrícolas, a su vez, presentaron una diferencia significativa con el control (Cuadro S5).

En los suelos estresados, SIR-van se recuperó en el corto plazo en todos los suelos y se mantuvo en esos niveles hasta rl-lp. Los controles, en cambio, mostraron un incremento adicional entre rl-cp y rl-lp, y tendieron a superar a los suelos estresados en esa última instancia de medición. Con ese incremento, el suelo de agro-c alcanzó los niveles de SIR-van del monte, pero ambos siguieron superando a agro-l ( $P \leq 0,01$ ).



**Figura 33.** Evolución de la respiración inducida por ácido vanílico (SIR-van) en el ensayo de estrés 2013 para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). Los tiempos de medición fueron: inicial, resistencia (rt), resiliencia de corto plazo (rl-cp) y de largo plazo (rl-lp). Letras diferentes señalan diferencias significativas entre tiempos de medición para un mismo tratamiento ( $\alpha=0,05$ ).

#### Ácidos grasos de los fosfolípidos

El análisis de PLFA se realizó en el ensayo de 2013 entre rt y rl-lp y se enfocó principalmente en el análisis multivariado de los perfiles de PLFA, debido a que los marcadores no arrojaron ningún patrón concreto que aportara a la comprensión de la respuesta al estrés. Se presentan también datos de biomasa viable (BMv) y abundancia del marcador de hongos, 18:2 $\omega$ 6,9. En todos los casos, los resultados en términos de resistencia se obtuvieron comparando suelos estresados y controles al tiempo rt, por faltante del dato inicial.

La BMv al tiempo rt sólo se afectó en agro-c, siendo 32,6% mayor en el suelo estresado que en el control, similar a lo que se observó en los suelos de monte en rl-cp (Cuadro S5). Esto fue acompañado de una menor abundancia relativa del marcador fúngico 18:2 $\omega$ 6,9 tanto para agro-c como para el suelo de monte (Cuadro S5). Ninguno de los suelos estresados modificó su BMv en el corto plazo de recuperación, mientras que el tratamiento control de agro-c aumentó su BMv a lo largo de la incubación (Cuadro 16). El marcador de hongos no se modificó significativamente en suelos estresados ni controles, aunque en los primeros mostró una tendencia a reducirse entre rt y rl-lp (Cuadro 16).

La Figura 34 muestra la evolución de estos perfiles de PLFA por tiempo para cada ambiente y viceversa. Analizando por tiempo, se observa que en rt las comunidades sometidas a estrés hídrico de los tres ambientes fueron relativamente similares y que se diferenciaron de sus respectivos controles, salvando el suelo de monte, que presentó mayor dispersión en estos últimos (Figura 34A, rt). El ANOSIM de dos vías detectó que la composición de las CMS se diferenció tanto por el ambiente como por el tratamiento de estrés ( $R=0,86$  y  $P=0,008$ ;  $R=0,75$  y  $P=0,037$ , respectivamente). En un análisis de una vía se encontró que abarcando suelos estresados y controles, las CMS que difirieron entre

sí fueron las de agro-c y agro-l, como se ve en la Figura 34A-rt ( $R=0,77$ ;  $P=0,028$ ). Luego de 12 días de recuperación, el tratamiento de estrés dejó de tener efecto en la estructura de las CMS, mientras que el uso de la tierra tuvo un efecto mínimo, con pequeñas diferencias entre el ambiente de monte y el de larga historia agrícola ( $R=0,29$ ;  $P=0,029$ ). En rl-lp el agrupamiento se definió principalmente por el uso de la tierra, con menor influencia del tratamiento de estrés (Figura 34A, rl-lp). En esta instancia el ANOSIM de dos vías encontró un efecto del factor ambiente ( $R=0,91$ ;  $P=0,007$ ) y el de una vía encontró diferencias en la composición de PLFA entre las CMS de agro-l y las de agro-c y monte ( $R=0,89$  y  $P=0,028$ ;  $R=0,98$  y  $P=0,029$ , respectivamente).

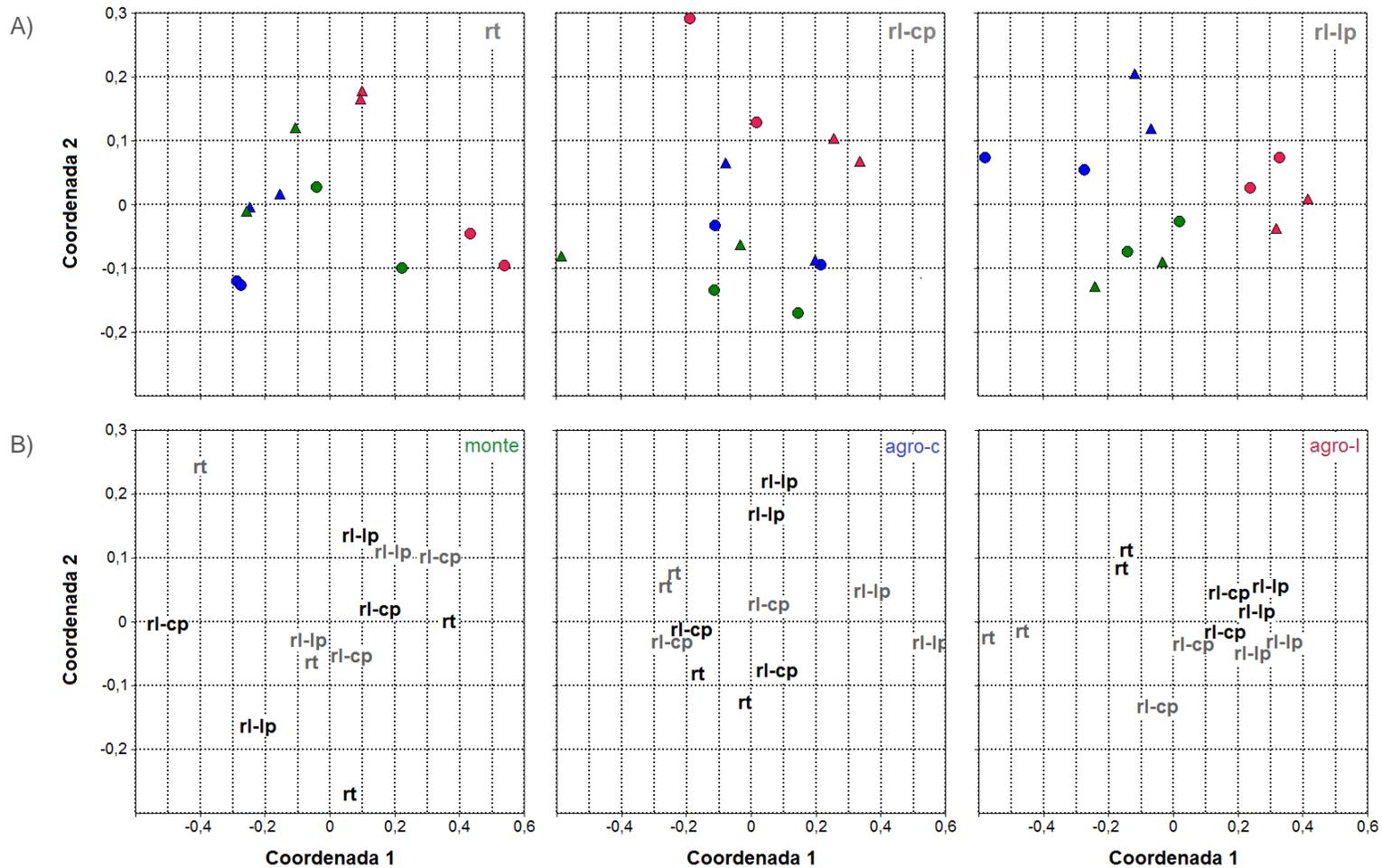
**Cuadro 16.** Biomasa viable (BMv) y abundancia de hongos obtenidas a partir de la técnica PLFA para el suelo de monte y los suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente) sometidos a estrés y control en tres tiempos de medición: resistencia (rt), resiliencia a corto plazo (rl-cp) y resiliencia a largo plazo (rl-lp)

		monte			agro-c			agro-l		
		rt	rl-cp	rl-lp	rt	rl-cp	rl-lp	rt	rl-cp	rl-lp
<b>BMv</b> (PLFA total)	estrés	274,7 a	279,0 a	203,9 a	142,1 a	126,5 a	158,5 a	123,7 a	78,0 a	45,8 a
	control	235,4 a	218,2 a	224,0 a	107,2 b	136,9 ab	206,5 a	138,6 a	100,6 a	49,5 a
<b>Hongos</b> (18:2ω6,9)	estrés	0,99 a	0,78 a	0,70 a	1,07 a	0,67 a	0,53 a	0,56 a	0,55 a	0,32 a
	control	0,68 a	0,88 a	0,65 a	0,68 a	0,64 a	0,73 a	0,49 a	0,23 a	0,28 a

*Los datos de la medición inicial corresponden a las condiciones de campo y no, como en el resto de los ensayos, al momento posterior a la pre-incubación.*

Al analizar los datos por ambiente surgió información sobre la dinámica del perfil de PLFA de la comunidad de cada suelo durante el ensayo de estrés. En el caso de monte, a pesar de que las figuras anteriores sugerían un cambio gradual, se observa que presentaron una alta dispersión sin un patrón de acuerdo al tiempo de medición (Figura 34B, monte). En el ambiente agro-c se observó una evolución de los perfiles de PLFA tanto para los suelos estresados como para los controles, que parecieran asemejarse en el corto plazo para luego volver a diferenciarse en rl-lp (Figura 34B, agro-c). El patrón de agro-l es el más claro, con una gran distinción luego de acontecido el estrés y una posterior evolución hacia lo que pareciera ser una situación de equilibrio, ya que estresados y controles fueron muy similares en el corto y en el largo plazo (Figura 34B, agro-l). Según el ANOSIM de dos vías, sólo en agro-l el factor “tiempo de medición” determinó comunidades diferentes ( $R=0,97$ ;  $P=0,005$ ).

Las diferencias en los perfiles de PLFA no mostraron ninguna relación consistente con las estructuras químicas de los ácidos grasos (Figura S6).



**Figura 34.** NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de los perfiles de PLFA en A) los distintos tiempos de medición y B) los distintos ambientes evaluados. En A: **verde:** monte, **azul:** agrícola de corta historia (agro-c), **rojo:** agrícola de larga historia (agro-l); **triángulos:** estrés, **círculos:** control. En B: **rt:** resistencia, **rl-cp:** resiliencia a corto plazo, **rl-lp:** resiliencia a largo plazo; **negro:** estrés, **gris:** control.

#### 4 - Discusión

En este capítulo se simuló un estrés hídrico severo, bajo temperaturas estivales, y se evaluó su efecto sobre aspectos estructurales y funcionales de las CMS provenientes de una cronosecuencia agrícola evaluada en capítulos anteriores (monte, agrícola de corta y agrícola de larga historia de la finca LR) en dos años de muestreo (2011 como ensayo preliminar y 2013). La mayoría de las interpretaciones en términos de resistencia y resiliencia se realizaron principalmente a partir del análisis que siguió la variación temporal de suelos estresados y controles (*i.e.*, el presentado en las Figuras 29 y 30) porque, independientemente del ambiente estudiado, en muchas variables se registraron fluctuaciones en los tratamientos control, las cuales podrían deberse a un efecto de la temperatura de incubación y/o a la dinámica propia de las CMS. Otros autores también registraron variaciones en sus microcosmos control (Chaer *et al.*, 2009a). Bérard *et al.* (2011), por ejemplo, observaron cambios en RB, SIR-glu y algunas variables estructurales a lo largo de una incubación de 84 días a 25° y humedad controlada.

Al inicio del ensayo, la BMm fue superior en suelos de monte, tal como el CBM medido en el Capítulo 2. BMm resultó más sensible y permitió distinguir entre ambientes agrícolas, probablemente debido a que, o bien el método de BMm fue más sensible que CBM, o bien ambos suelos se diferenciaron en respuesta a la pre-incubación o cambios durante el almacenamiento. La mayor variabilidad encontrada en las determinaciones de 2013, en especial en suelos de larga historia agrícola, podría responder a limitaciones de la metodología utilizada para detectar niveles muy bajos de ADN.

Las reducciones en BMm observadas luego del evento de estrés hídrico fueron esperables debido a que no todos los microorganismos son capaces de formar estructuras de resistencia (esporas, quistes) o activar otros mecanismos que les permitan sobrevivir a condiciones de deshidratación extrema (Schimel *et al.*, 2007; Meisner *et al.*, 2015). Los mecanismos de resistencia intrínseca (por ejemplo, pared celular de bacterias Gram positivas) o de aclimatación en respuesta a un estrés, podrían no ser suficientes ante un estrés muy severo, derivando en dormición (esporas, quistes) o eventualmente muerte (Schimel *et al.*, 2007). Existen antecedentes de reducciones en la biomasa microbiana luego de períodos de estrés de diferente duración (Gordon *et al.*, 2008; Hueso *et al.*, 2011).

Sin embargo, la BMm no fue igualmente sensible en todos los ambientes y esto, a su vez, difirió entre ambos ensayos. Los ambientes agrícolas parecieron presentar una BMm más estable, aunque las CMS de agro-c fueron más sensibles que las de agro-l en el muestreo del año húmedo (2011). La variabilidad que presentó agro-l en rt de 2011 podría implicar que esa resistencia no se haya expresado a nivel global, sino con gran heterogeneidad, quizás a escala de micrositio. Una forma de testear esta hipótesis sería a través de un nuevo ensayo, más exhaustivo, que permita revelar la verdadera relevancia del fenómeno. De cualquier manera, en el ensayo 2013 el comportamiento de agro-l fue más consistente, mostrando también una biomasa resistente. Esta resistencia, junto con el aumento en BMm que registraron estos suelos en la etapa de recuperación, podría explicarse por la presencia de CMS que, durante la historia de cultivo, pasaron por un largo proceso de adaptación al estrés hídrico y a los ciclos de secado-re-humedecimiento, debido a su mayor exposición a las fluctuaciones climáticas dadas principalmente por la estructura y estacionalidad de la cobertura vegetal (Fierer y Schimel, 2002). Una adaptación a largo plazo como ésa, por ejemplo, podría estar seleccionando a favor de microorganismos con mecanismos inherentes de resistencia, los cuales son más eficaces que la aclimatación inducida, la cual requiere de recursos al momento de la inducción y tiempo suficiente para expresarse (Schimel *et al.*, 2007).

La BMm de las CMS monte no presentaron resistencia en ninguno de los ensayos, pero sí resiliencia o capacidad de recuperación, y en 2011 ésta superó al ambiente agro-c. La resiliencia de esas CMS podría responder a sus mayores niveles de biomasa microbiana inicial o la diferente composición de la comunidad (por ejemplo, la mayor relación hongos:bacterias hallada en el Capítulo 3, siendo que los hongos son más resistentes a las condiciones de desecación). Es llamativo cómo las CMS de agro-c resultaron más frágiles y presentaron mayores dificultades para recuperar su biomasa inicial en el ensayo de 2011. Esto podría interpretarse en base a lo expuesto anteriormente: en primer lugar, esos suelos presentaron menor biomasa inicial que los del monte como consecuencia del cambio en el uso de la tierra, a la vez que, a diferencia de agro-l, todavía estarían transitando un proceso de adaptación al disturbio y las fluctuaciones ambientales del ambiente agrícola. Comparando agro-c entre ensayos, parecería que el déficit hídrico “a campo” ocurrido en 2013 (ver Capítulo 2) contribuyó con su capacidad de resistir al estrés hídrico impuesto, aunque también podría haber un efecto de los dos años transcurridos entre muestreos (mayor tiempo de adaptación). Sin embargo, la primera hipótesis se refuerza si se tiene en cuenta que la velocidad de recuperación fue mucho mayor en 2013 para todos los ambientes, mientras que las CMS de las muestras de 2011 recuperaron su BMm a más largo plazo. Tal como se explicará más adelante, el aumento en biomasa que sigue al rehumedecimiento es propiciado, en parte, por recursos liberados en la muerte celular causada por la sequía (crecimiento críptico), y podría estar dado por el desarrollo de especies de rápido crecimiento (Bérard *et al.*, 2011). En concordancia, determinaciones complementarias del ensayo de 2013 señalaron un incremento en el número de bacterias cultivables durante la recuperación (Ortiz, 2015).

Por último, al observar la dinámica de BMm en los controles, es llamativo que éstos hayan acompañado a los suelos estresados en su dinámica de recuperación. En el ensayo de 2011 podría tratarse de un efecto de la alta temperatura de incubación, pero en el caso de las muestras de 2013 parte de ese comportamiento podría ser un artefacto, ya que coincide con un breve período de déficit hídrico accidental por el que pasaron esos microcosmos (5 d sin riego seguidos de 7 d al 60% CC antes de la medición de rl-cp). Al igual que el estrés hídrico testeado, este breve evento pudo haber estimulado el crecimiento de la biomasa. En el estudio de Meisner *et al.* (2015), 4 días de estrés hídrico fueron suficientes para alterar el funcionamiento de las CMS, incluso más si esos suelos provenían de una incubación previa con suficiente disponibilidad hídrica. Aun así, queda por comprender por qué ese efecto sobre la biomasa fue temporal y cayó en rl-lp.

Los resultados de BMv se pueden discutir de manera restringida, comparando suelos estresados y control al tiempo rt. La BMv al momento del muestreo fue superior en el monte, tal como se describió en el Capítulo 3, pero no exhibió una respuesta clara al estrés hídrico. Un resultado interesante fue que el período de pre-incubación parece haber sido favorable a un nivel tal que, aún luego del estrés impuesto de 28 días, la BMv fue superior a la de las condiciones de campo en todos los ambientes. Esto es llamativo si se tienen en cuenta antecedentes en los cuales las incubaciones de suelos húmedos eventualmente redujeron la biomasa y la actividad (*e.g.*, Meisner *et al.*, 2015), pero podría estar resaltando el nivel de estrés de esas comunidades microbianas al momento del muestreo. Como se mostró en el Capítulo 2, el muestreo de 2013 se realizó durante un largo período de sequía en el que las precipitaciones sumaron ~335 mm en un año, el 25% concentrado en la época de lluvias. Analizando los resultados al tiempo rt, la relación entre suelos estresados y controles fue inconsistente entre ambientes y con BMm, ya que el estrés no llevó a una reducción de BMv relativa a los controles. Esa incongruencia entre estimadores de biomasa podría responder al blanco de cada metodología (ADN o

fosfolípidos de membrana). Meisner *et al.* (2015), por otro lado, proponen que la incubación de suelos húmedos (en este caso los controles) puede derivar en un bajo número de microorganismos supervivientes y tener un efecto sobre la biomasa tan negativo como el secado prolongado. Esto ocurriría porque las condiciones de incubación favorecen la respiración y eventualmente derivan en una menor disponibilidad de carbono, una menor actividad y, junto con ella, una menor biomasa.

Al igual que en los análisis del Capítulo 2, la RB al inicio del ensayo de 2011 fue superior en el suelo de corta historia agrícola, aun cuando los suelos de este ensayo pasaron por una pre-incubación de 10 d a 25°C. Este resultado refuerza la hipótesis de que la alta tasa respiratoria de esos suelos responde a una particularidad de sus comunidades microbianas y no, al menos no exclusivamente, a un efecto transitorio como podría ser la disponibilidad de C lábil, el cual probablemente fue consumido durante esa pre-incubación. No obstante, esta mayor RB no se reflejó en la RE, sino que ésta señaló una menor eficiencia metabólica en las CMS con larga historia de cultivo. A diferencia del Capítulo 2, donde la dinámica del  $qCO_2$  está determinada principalmente por la RB, aquí las diferencias en RE responden principalmente a la BMm, en especial entre suelos agrícolas. En 2013, los niveles iniciales de RB y RE no difirieron entre ambientes y mostraron gran variabilidad intra-sitio. Al igual que se observó en el Capítulo 2 para el  $qCO_2$ , los valores de RE advierten sobre un factor común afectando el metabolismo de las comunidades microbianas de todos estos suelos. En este ensayo se suma el efecto de la pre-incubación, la cual implicó un re-humedecimiento que probablemente haya estimulado la respiración y biomasa de las comunidades microbianas de todos los suelos, según se explica a continuación.

Aun habiendo diferencias iniciales entre años de muestreo y ambientes, la RB en todos los casos tuvo una respuesta al estrés hídrico consistente. Esta respuesta está extensamente reportada en la literatura, y consistió en un incremento, con mayor o menor variabilidad, posterior al evento de estrés hídrico. Ese incremento en la emisión de  $CO_2$  en respuesta al re-humedecimiento (necesario para hacer la determinación de RB) se conoce como efecto Birch, en reconocimiento de uno de los primeros investigadores en registrar este fenómeno (Birch, 1958). El efecto Birch es producto de un aumento en la disponibilidad de CO disuelto, el cual a su vez parece tener tres orígenes: la liberación acelerada de los osmolitos acumulados por los microorganismos durante el período de estrés (Fierer y Schimel, 2002; Schimel *et al.*, 2007), la alteración física de los agregados durante el secado-re-humedecimiento (Denef *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 2006), y la muerte y lisis celular de los microorganismos (Kieft, 1987). Este último fenómeno, conocido como crecimiento críptico (Chapman y Gray, 1986), parece ser el mecanismo preponderante, según se observó en caídas concomitantes de biomasa microbiana durante el secado (Griffiths *et al.*, 2003; Pesaro *et al.*, 2004). Por la complejidad que subyace al efecto Birch, es controversial hablar de resistencia y resiliencia de la RB, ya que son demasiados los mecanismos subyacentes y no reflejan únicamente el estado fisiológico de la comunidad.

El porcentaje del incremento respiratorio fue relativamente similar entre ambientes y ensayos y, considerando que en la pre-incubación probablemente se haya consumido buena parte del C lábil, el C- $CO_2$  sería casi exclusivamente el liberado por alguno de los mecanismos del efecto Birch. Según Meisner *et al.* (2015), la duración del período de sequía es un factor clave, ya que determina cuántos organismos sobreviven y, en relación con esto, cuánto C se libera en el re-humedecimiento. En los casos donde el incremento en RB no fue significativo (agro-l de 2011 y agro-c de 2013), esto estuvo asociado a una gran variabilidad intra-sitio posterior al estrés y nuevamente podría estar evidenciando

una característica intrínseca de esas CMS. En cualquier caso, estos dos suelos agrícolas estarían mostrando una alteración menos marcada que otros suelos, algo que Fierer y Schimel (2002) atribuyeron a una mayor adaptación a ciclos de secado-re-humedecimiento por parte de esas CMS.

El efecto del año de muestreo sobre RB no fue el esperado según lo planteado por Yu *et al.* (2014). De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores, sucesivos ciclos de secado-re-humedecimiento reducirían la intensidad del “pico” respiratorio; sin embargo, los suelos de 2013, que ya habían pasado por un re-humedecimiento (*i.e.*, desde la condición de déficit hídrico “a campo” a los 60% CC de la pre-incubación) respondieron de manera similar a los de 2011, e incluso presentaron mayores niveles de RB y RE. Otras diferencias entre ensayos podrían explicarse por la menor profundidad de muestreo en 2013, que pudo haber generado un efecto de “concentración” de la actividad microbiana por unidad de masa de suelo, tal como se discutió en el Capítulo 2. Por último, en ambos ensayos el período de recuperación estuvo caracterizado por una rápida reducción en los niveles de RB que probablemente se explique por un agotamiento de las fuentes de C lábil liberadas luego del estrés.

El hecho de que RE haya seguido la dinámica de la RB, implica que el incremento respiratorio asociado al efecto Birch, así como su recuperación hacia el final de la incubación, puede interpretarse también en términos de eficiencia metabólica. En este sentido, las CMS de monte presentaron una mayor eficiencia metabólica (menor RE) aún luego de acontecido el estrés hídrico. Por otro lado, siguiendo la dinámica que se observó en BMm, los suelos de 2011 presentaron mayor dificultad para restablecer su eficiencia metabólica, mientras que los de 2013 lo hicieron en 24 h (ver Figura S5). Entre los suelos del muestreo 2013, nuevamente el sitio de larga historia agrícola pareció tener mayor resiliencia que el de corta, fortaleciendo la hipótesis de adaptación planteada al inicio de esta discusión. Las variaciones en eficiencia metabólica podrían estar respondiendo a la cantidad de recurso que se invirtió en tolerar y recuperarse del estrés, y, por ende, cuánto fue destinado al crecimiento y la recuperación de la biomasa. Los mecanismos de resistencia o tolerancia al estrés, ya sean inherentes o de aclimatación, implican un costo energético que de otro modo sería destinado al crecimiento (Schimel *et al.*, 2007).

Según el estudio de Meisner *et al.* (2015), de acuerdo con la duración del período de estrés (~4 semanas) y los 10 días de pre-incubación al 60% CC, todos los suelos ensayados deberían tener una respuesta que ellos denominan de tipo 2: un lag de algunas horas seguido de un crecimiento exponencial acoplado a un incremento respiratorio. Por la duración de las incubaciones de respiración y los intervalos de medición de biomasa (mínimo 24 h posterior al estrés), esto no puede conocerse con precisión, pero es factible que haya sido el mecanismo subyacente en el ensayo de 2013, donde la biomasa se recuperó en 24 h luego del re-humedecimiento, junto con el incremento respiratorio. Sin embargo, es llamativo el comportamiento de los suelos de 2011, en especial de corta historia agrícola, en cuanto al desfase entre respiración y biomasa: presentan un incremento respiratorio al que no le sigue un aumento en biomasa, sino que ésta aumenta al cabo de varios días. Además del costo energético asociado a la recuperación mencionado anteriormente, Meisner *et al.* (2015) enuncian una serie de factores puntuales que podrían estar ocurriendo cuando se observa un incremento respiratorio sin un aumento en biomasa: retraso en el crecimiento fúngico, crecimiento inicial de células durmientes o acción de enzimas oxidativas aun activas en organismos dañados o muertos. Independientemente de los mecanismos subyacentes, es clara la diferencia entre ambos muestreos y es muy probable que se relacione a la sequía “a campo” del muestreo 2013 sobre la mayor capacidad de recuperación de esas CMS ante el estrés hídrico impuesto,

tanto en términos de biomasa como de eficiencia metabólica (*i.e.*, el C liberado luego del re-humedecimiento fue utilizado tanto para la recuperación como para el crecimiento de la comunidad sobreviviente).

Junto con la RB se determinó SIR en respuesta a dos sustratos carbonados esperables en el medio natural: la glucosa como parte de los exudados radicales o subproducto de la degradación de otros compuestos (Campbell *et al.*, 1997), y el ácido vanílico como sustrato más complejo intermediario de la degradación de lignina (Pyle, 2012). La SIR-glu a corto plazo es utilizada como indicador de la biomasa (Anderson y Domsch, 1978) y, a pesar de que aquí las incubaciones son más largas, se esperaba una relación positiva entre estas variables. Por el contrario, se observó que tanto el suelo de monte como de agro-c, con prácticamente la mitad de BMm, respondieron al agregado de glucosa con igual magnitud. Este resultado está en relación con que a estos suelos se le había adjudicado una mayor proporción de microorganismos copiotróficos por su comportamiento en RB y  $qCO_2$  (Capítulo 2). Los microorganismos de tipo copiotrófico responden rápidamente ante el agregado de sustratos carbonados fácilmente utilizables (Fierer *et al.*, 2007b) y en este caso la respuesta a la glucosa por unidad de biomasa microbiana es precisamente mayor a la del monte. La variabilidad de las CMS de larga historia en términos de BMm, y en parte en RB, no se vio reflejada en la utilización de sustratos, probablemente porque la incorporación de sustratos carbonados desencadena una rápida respuesta en los microorganismos del suelo, iniciada por aquellos capaces de degradarlo con mayor eficiencia.

Es importante tener en cuenta dos cuestiones al interpretar los resultados de SIR: en primer lugar, que la incorporación de un único sustrato representa un desequilibrio de lo esperable en el suelo; en segundo lugar, que, al incorporar un sustrato fácilmente utilizable al suelo, son diversos los mecanismos que se disparan (*i.e.*, el  $CO_2$  emitido no necesariamente proviene de la mineralización del sustrato incorporado). Por ejemplo, ensayos con  $^{14}C$ -glucosa, determinaron que el consumo del sustrato en un período de 7 días estuvo entre el 38-51% de lo incorporado (Saggar *et al.*, 1999; Falchini *et al.*, 2003). El resto del  $CO_2$  emitido podría, por ejemplo, provenir de la materia orgánica del suelo, de estar dándose un fenómeno conocido como *priming*, donde la estimulación de la actividad microbiana deriva en una mineralización de compuestos orgánicos del suelo. El fenómeno es aún más complejo, ya que junto con este proceso pueden ocurrir otros, de *priming* aparente, como un incremento en la tasa ciclada de la biomasa microbiana y reservas, lo cual deriva también en un incremento de las emisiones de  $CO_2$  (Bremer y Kuikman, 1994; Blagodatskaya y Kuzyakov, 2008). Según estos autores, en períodos de incubación cortos, como los utilizados en este ensayo, el posible *priming* será principalmente de ese tipo y no de mineralización de la materia orgánica del suelo. Por todo lo antedicho, sería sumamente interesante realizar estas pruebas de SIR con técnicas isotópicas.

En el caso de SIR-glu, donde se incorporó un sustrato de rápida utilización por la comunidad microbiana, no se evidenciaron claras respuestas al estrés ni mayores diferencias entre ambientes. Esto probablemente no sólo tenga que ver con la facilidad con la que se utiliza el sustrato sino también con la cadena de eventos que siguen a esa activación de la comunidad copiotrófica, tal como se explicó anteriormente. La única excepción fue una leve caída en agro-l de 2011, el cual se correspondió con una tendencia a una caída en biomasa. En el resto de los casos, la SIR-glu aumentó o tendió a superar a los valores iniciales en rl-cp, con lo cual se podría decir que esas comunidades tienen una mayor capacidad para responder al sustrato agregado. No se puede atribuir este resultado a un aumento en biomasa ya que en el período de recuperación encontró una relación

consistente entre SIR-glu y BMm. Algo similar se observa para estresados y control de 2013, y en todos los casos podría estar sugiriendo que la respuesta se altera por un cambio en la estructura de la comunidad microbiana entre rl-cp y rl-lp, aunque éste no pudo ser detectado por el método de PLFA.

La respuesta respiratoria al agregado de vaníllico (muestras de suelo de 2013) resultó más sensible para discriminar entre distintos ambientes tanto al inicio del ensayo como en cuanto a su resistencia al estrés hídrico. Los suelos de monte presentaron una mayor capacidad de respuesta al ácido vaníllico y una mayor resistencia de esta variable al estrés hídrico, sugiriendo que su capacidad metabólica es mayor y más estable. Dadas las características del ácido vaníllico, esto podría deberse en parte a la mayor abundancia relativa de hongos en esos suelos (Capítulo 3). Esta idea se fortalece con el hecho de que, en las muestras de suelo monte, luego de la incubación con este sustrato encontramos un gran desarrollo de micelio fúngico, correspondiente principalmente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ambos habitantes comunes del suelo. A pesar de que los tres ambientes presentaron menor SIR-van luego del estrés hídrico, esta caída fue más marcada en los ambientes agrícolas, en especial el de corta historia. En el suelo de monte esa reducción podría responder a que sufrieron una caída más marcada en biomasa, algo que en los agrícolas no fue tan notable. Estas diferencias en resistencia entre SIR-glu y SIR-van coinciden con lo planteado por varios autores, sobre que funciones menos generales, como la degradación de un compuesto más complejo o recalcitrante, podrían ser más sensibles a un disturbio o situación estresante por estar restringidas a grupos funcionales más específicos (Griffiths *et al.*, 2000; Chaer *et al.*, 2009a). Aquí esas restricciones se observaron en incubaciones de 72 h, pero es probable que la utilización de ambos sustratos se equiparara eventualmente, tal como observaron Falchini *et al.* (2003) al comparar la respuesta al agregado de glucosa y de ácido oxálico. La ventaja de estudiar esta respuesta en el corto plazo (incubación de 72 h) consiste precisamente en evitar que la comunidad se modifique y se adapte al sustrato incorporado (Falchini *et al.*, 2003), remarcando así diferencias funcionales entre las CMS (Ortiz *et al.*, 2015). Son varios los estudios que demostraron que la estructura de la comunidad microbiana se modifica en respuesta a la adición de un sustrato carbonado (Eilers *et al.*, 2010). Según lo observado por Falchini *et al.* (2003), la incorporación de compuestos de bajo peso molecular favoreció el desarrollo de bacterias (probablemente copiotróficas) capaces de utilizar ese sustrato.

Los perfiles de PLFA (muestras de suelo de 2013), al igual que la BMv, no pueden ser apropiadamente evaluados en términos de resistencia al no contar con la determinación inicial. Sin embargo, se evidenció un efecto del estrés hídrico, en especial en los suelos agrícolas, al comparar suelos sometidos a estrés con controles (y viendo la similitud entre suelos estresados de distintos ambientes). Este resultado sugiere que hay un perfil asociado a las condiciones de estrés hídrico, en especial en el caso de suelos agrícolas. En el suelo de monte, en cambio, la dificultad para detectar cambios en respuesta al tratamiento de estrés hídrico podría deberse a que la diversidad en esos suelos es mayor (algo que sugiere la gran dispersión de los sitios, a pesar de que los PLFA no caracterizan estrictamente la diversidad de la comunidad – Figura 34B, monte). De este modo, los cambios en la abundancia de algunos fosfolípidos, ya sea por modificaciones taxonómicas o por respuesta fisiológica al estrés, podrían estar enmascarados. Las condiciones de déficit hídrico son capaces de modificar el perfil de fosfolípidos por al menos dos mecanismos. Por un lado, puede haber una reestructuración de la comunidad por inhibición o muerte de especies sensibles y, por ende, selección de especies tolerantes (Bérard *et al.*, 2011). Asimismo, muchos microorganismos pueden modificar sus ácidos

grasos de membrana como estrategia fisiológica para sobrellevar las condiciones ambientales (Moore-Kucera y Dick, 2008).

En la etapa de resiliencia, los suelos parecen estar transitando una recuperación gradual, ya que desde el corto plazo deja de existir un efecto del estrés sobre la estructura de las CMS. Ya en el largo plazo, son claras las diferencias entre la composición de fosfolípidos de distintos ambientes, a pesar de que, dentro de cada uno, persiste una separación entre los que pasaron por el estrés hídrico y los que no. En contraposición, el trabajo de Chaer *et al.* (2009a), comparando la estabilidad de las comunidades microbianas de suelos agrícolas y forestales al estrés térmico, encontró que no sólo difirieron ambos ambientes al inicio del ensayo, sino que mantuvieron esas diferencias entre ellos una vez acontecido el evento de estrés. Algo para destacar es que las CMS del tiempo rl-lp fueron más heterogéneas en los suelos de agro-c, los cuales, a su vez, presentaron menor variación en la recuperación a corto plazo (*i.e.*, similitud entre rt y rl-cp en Figura 34B, agro-c). Ambos aspectos remarcan la mayor dificultad de estos suelos para recuperarse del estrés impuesto y alcanzar una nueva situación de equilibrio. En agro-l, en cambio, ese nuevo equilibrio parece alcanzarse en el corto plazo (*i.e.*, similitud entre todas las mediciones de recuperación), aún a pesar del efecto marcado del estrés hídrico (*i.e.*, distancia entre rt de control y estrés). En ambos suelos agrícolas, la modificación que sufren los perfiles de PLFA de los controles sugiere nuevamente un efecto de las condiciones de incubación y, siguiendo el análisis anterior, los suelos control también parecen reestablecerse más rápidamente en el suelo de agro-l. Con respecto al suelo de monte, la ausencia de patrón y la mayor dispersión observada en el análisis del suelo de monte sugiere nuevamente que la gran diversidad estructural de esos suelos amortiguó, a nivel global, el efecto del estrés y las variaciones en el tiempo de incubación. Es llamativo que los cambios observados en los perfiles de PLFA no se hayan relacionado claramente con ninguno de los marcadores calculados, ni siquiera los de *status* fisiológico, aunque también destaca la complejidad de interpretar perfiles de PLFA. Otros autores, no obstante, encontraron un incremento en el cociente cy:pre, indicador de condiciones estresantes, en respuesta al estrés hídrico (Moore-Kucera y Dick, 2008).

Las respuestas al estrés hídrico observadas en este capítulo mostraron algunas diferencias entre las CMS de los tres ambientes evaluados. Esto es interesante no sólo porque caracteriza de manera más dinámica a las CMS de la cronosecuencia agrícola sino también porque las distintas respuestas ante un evento estresante, en este caso un déficit hídrico severo sumado al disturbio del re-humedecimiento, podrían expresarse *in situ*, con distinta repercusión sobre el ecosistema. Se sabe, por ejemplo, que el efecto Birch es un fenómeno relevante en distintos ecosistemas, donde constituye una parte importante de la respiración heterotrófica de los suelos (Meisner *et al.*, 2015). Las estrategias de resistencia o tolerancia al déficit hídrico implican un alto costo energético y, según Schimel *et al.* (2007), podrían tener impacto a gran escala en términos de salidas de carbono orgánico del sistema, en especial si se tiene en cuenta la baja eficiencia de asimilación de los microorganismos (~10-50% del C consumido).

Asimismo, los dos ensayos realizados mostraron diferencias que podrían responder a las particularidades de cada muestreo, en particular al déficit hídrico encontrado en 2013. Esto debe interpretarse con precaución debido a que los ensayos no estuvieron planteados para comparar CMS de diferentes años de muestreo, además de que presentaron diferencias en el almacenamiento, y la duración de la pre-incubación y estrés hídrico. Las diferencias en el almacenamiento previo al ensayo fueron imperativas debido a que las muestras de 2011 tuvieron que ser almacenadas durante más tiempo y, en circunstancias como ésta, es preferible que el almacenamiento prolongado se haga a -20°C y no a 4°C

(Bloem *et al.*, 2006). Resulta interesante, no obstante, que aun habiendo sido sometidos a un estrés hídrico 40% más prolongado, los suelos de 2013 hayan mostrado en términos generales una mejor respuesta al estrés hídrico. A futuro, para evaluar si realmente existe una capacidad de adaptación a la sequía dada por un evento de estrés hídrico anterior, es recomendable analizarlo experimentalmente, realizando ensayos que hagan un seguimiento estricto de las CMS en sucesivos eventos de estrés hídrico impuestos. También sería interesante incorporar más variables como SIR-van, que apunten a estudiar la sensibilidad de funciones más específicas, ya sea a través de la utilización de diferentes sustratos como de la predominancia de distintos grupos funcionales.

## **5 - Conclusiones**

Estos ensayos de estrés hídrico inducido permitieron comparar suelos de monte y suelos con diferente tiempo bajo uso agrícola en términos de su resistencia y capacidad de recuperación, pero presentaron complicaciones, como la variación de los controles, que deberían ser contempladas para futuros estudios. El comportamiento de las CMS de distintos ambientes dependió del aspecto evaluado y del momento de muestreo. Suelos de monte parecieron presentar mayor resistencia en su estructura (PLFA) y en la utilización de un sustrato complejo (SIR-van), pero los suelos agrícolas, en especial de larga historia, presentaron mayor resistencia o capacidad de recuperación de su biomasa, así como una rápida recuperación de su composición de PLFA. El muestreo en un año seco pareció influir sobre la estabilidad de las CMS, que presentaron mayor resistencia en biomasa y respiración específica, además de disipar las diferencias entre ambientes en el período de recuperación (que en el año húmedo parecieron otorgar ventaja a los suelos agrícolas). Mientras que las CMS de monte podrían estar caracterizadas por una mayor complejidad estructural que les otorga mayor estabilidad en algunos aspectos, las de suelos agrícolas parecen haber pasado por un proceso de adaptación resultado de los sucesivos años de exposición a fluctuaciones ambientales. Esto explicaría por qué en general las CMS de suelos de corta historia agrícola parecieron más frágiles o se recuperaron más lentamente que las de larga historia agrícola. Los resultados reflejan la complejidad de este tipo de estudios, donde las variables en juego son múltiples, pero pusieron en evidencia patrones interesantes que invitan a seguir indagando en la respuesta de las CMS a eventos estresantes y su relación con el uso de la tierra y el manejo agrícola.



## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSIONES GENERALES**



Esta tesis se propuso como objetivo general estudiar la respuesta de las comunidades microbianas del suelo (CMS) al cambio en el uso de la tierra, en particular el desmonte para la implementación de cultivos extensivos, en una zona productiva del departamento de Anta, Salta, caracterizada por un pronunciado avance de la frontera agrícola sobre tierras prístinas de pedemonte de Yungas. El estudio se abordó apuntando a caracterizar dos aspectos generales de estas CMS, su estructura y su función, en suelos prístinos y suelos agrícolas de diferente antigüedad de uso, construyendo lo que se conoce como cronosecuencia agrícola. Esta sustitución espacio-tiempo permitió inferir sobre la dinámica de un proceso de alrededor de 30 años de duración sin recurrir a un estudio a largo plazo, cuya factibilidad es reducida. Por otro lado, al articularse con un muestreo en fincas, se pudo fortalecer la representatividad de los resultados obtenidos, que podrían estar caracterizando a otros suelos de la misma zona.

El desarrollo de esta tesis presentó dificultades en varios niveles, en general ligados a limitaciones operativas o de costo. En primer lugar, por más que el muestreo haya sido diseñado en fincas y esto haya aportado potencia a los análisis, el número de fincas y de sub-sitios a tomar estuvo limitado a las capacidades de procesamiento, las cuales fueron determinadas en un muestreo y análisis preliminares realizados en el año 2010. Un mayor número de fincas permitiría extender las conclusiones y tener más precisión sobre el comportamiento de las CMS de la región ante el cambio en el uso de la tierra, a la vez que los sub-sitios informarían sobre la variabilidad intra-sitio de cada aspecto de las CMS evaluado. Idealmente, de contar con los sitios necesarios, la variable de tiempo bajo uso agrícola podría tratarse como continua en los modelos estadísticos, algo que podría ser particularmente interesante para evaluar diferencias entre suelos cultivados. Del mismo modo, cuanto más puedan acompañarse esos datos de propiedades físico-químicas (a nivel sub-sitio), más relaciones pueden establecerse entre el medio biótico y abiótico, pudiendo incluso aplicarse modelos mixtos que utilicen a esas variables físico-químicas como predictivas para evaluar su influencia sobre cada variable microbiana.

Por otra parte, nos topamos con numerosas dificultades en los análisis de laboratorio, muchos de los cuales fueron puestos a punto durante el período de tesis (*e.g.*, CBM, RB, AF, HDAF, SIR, ADH, PLFA, qPCR). Estas dificultades, que nuevamente fueron tanto logísticas como económicas, en algunos casos obligaron a restringir el número de muestras analizadas (*e.g.*, propiedades físico-químicas y análisis microbiológicos en Capítulos 3, 4 y 5), comprometiendo la potencia al analizar los datos. En otros casos, llevaron a modificar las metodologías entre años de muestreo (actividad hidrolítica y CLPP), dificultando la comparación de esos resultados. Sumando complejidad, y obstáculos para la interpretación de los resultados, las condiciones del suelo en el muestreo 2013 condicionaron el estado de las CMS y no permitieron mantener la profundidad de trabajo.

A las limitaciones particulares de esta tesis se le suman las dificultades generales de estudiar las CMS. El suelo es un sistema sumamente heterogéneo, con variaciones a escala micrométrica, y las comunidades microbianas que lo habitan, por su gran sensibilidad y su íntima relación con el medio biótico y abiótico, son también enormemente diversas y heterogéneas. Así, el muestreo y la forma de analizar los datos deben tratar de responder a la interrogante que se plantea, apuntando a destacar los patrones asociados a ese factor (en este caso, el cambio en el uso de la tierra). La complejidad del sistema bajo estudio se acompaña de las limitantes técnicas: cada una de las metodologías disponibles para caracterizar un aspecto de las CMS, ya sea estructural o funcional, tiene sus propias restricciones y éstas deben ser tenidas en cuenta en la interpretación de los resultados. De este modo, un estudio descriptivo como el de esta

tesis, consiste en ir construyendo una caracterización global a partir de diferentes piezas de información y la relación entre ellas.

A pesar de las dificultades impuestas por todas esas limitaciones, muchas de ellas comunes a estudios en las áreas de ciencias biológicas y ecología, los resultados de esta tesis evidenciaron patrones interesantes que contribuyen en gran medida tanto al conocimiento de las CMS de la región como a la respuesta de las CMS al cambio en el uso de la tierra (*i.e.*, desmonte para la agricultura), tal como se planteó en el objetivo general. Los cambios observados indican que el cambio en el uso de la tierra puede alterar la biomasa, el metabolismo y la capacidad hidrolítica de las CMS, además de grupos taxonómicos como los hongos y grupos funcionales como los metanótrofos. Asimismo, se observó que esos cambios podrían reflejarse en procesos más complejos como la capacidad de respuesta ante un evento estresante. Todos los cambios observados tienen potencial repercusión sobre el funcionamiento del suelo, a través de la alteración de los ciclos biogeoquímicos. Dichos cambios pueden traducirse en una pérdida de servicios ecosistémicos como el secuestro de carbono y gases de efecto invernadero, y la fertilidad química y física de los suelos. Luego del cambio en el uso de la tierra, sucesivos años bajo el mismo manejo podrían moldear las CMS a partir de la presión de selección del ambiente agrícola.

El primer objetivo específico de esta tesis fue evaluar el comportamiento de la biomasa y funcionalidad de las CMS en una cronosecuencia agrícola y estuvo alineado con los objetivos de los capítulos 3 y 4. Se planteó la hipótesis de que las CMS serían mayormente afectadas por el cambio en el uso de la tierra y que, por ende, se verían cambios drásticos en los primeros años de cultivo. Esto respondería a la remoción de la cobertura vegetal nativa y su reemplazo por cultivos anuales, pero también por el disturbio que imprimen las tareas ligadas al desmonte y la implementación de la agricultura (*e.g.*, los primeros dos años se realizan con labranza convencional debido a las características del suelo recientemente desmontado). Los resultados avalaron esta hipótesis en buena parte, ya que los primeros 3-5 años de cultivo determinaron una caída en la biomasa microbiana total, una reducción más o menos marcada de la actividad hidrolítica potencial (principalmente actividad fosfatasa y amonificación), responsable de la mineralización de distintos compuestos orgánicos y la liberación de nutrientes al medio. Por otro lado, al inicio de la cronosecuencia se detectó una reducción marcada, pero reversible, de la eficiencia metabólica. Esto se evidenció a través de un incremento en la respiración basal y por unidad de biomasa (cociente metabólico o  $qCO_2$ ) en los suelos con 3-5 años de cultivo del muestreo realizado en 2011, lo cual sugiere una menor eficiencia en la utilización del carbono y podría inducir pérdidas de materia orgánica del suelo. Las reducciones en carbono orgánico que se observaron en el estadio agrícola de 13-16 años reforzaron esta hipótesis. En 2011 los suelos con menor cantidad de años bajo cultivo mostraron un comportamiento particular en muchas de las variables medidas. En primer lugar, la menor eficiencia metabólica ya mencionada, que podría explicarse por una mayor proporción de organismos copiotróficos o *r*-estrategas, fue un hallazgo que coincidió con un resultado obtenido por el grupo de trabajo al estudiar la comunidad bacteriana a partir de pirosecuenciación del gen 16S rRNA. En ese trabajo se encontró que los suelos de corta historia agrícola estuvieron caracterizados por dos OTUs pertenecientes a *Betaproteobacteria*, una clase que abarca varios taxones copiotróficos. En comparación con suelos de monte y de larga historia agrícola, estos suelos mostraron una alta respuesta específica (por unidad de biomasa) al agregado de glucosa, fortaleciendo esta hipótesis.

En el Capítulo 3, donde se estudió la estructura de la comunidad microbiana viable a través de los ácidos grasos de los fosfolípidos, la única variable que avaló esa hipótesis

fue la biomasa viable, que siguió el comportamiento de la biomasa total. No obstante, otras variables se modificaron a lo largo del período agrícola, como el marcador taxonómico de hongos, la relación hongos:bacterias y la proporción de ácidos grasos de 19 C con grupo ciclopropilo. A su vez, algunas estructuras, en su mayoría con ramificación central, se fueron perdiendo en la cronosecuencia. Estos ácidos grasos no se pudieron asociar directamente con ninguno de los marcadores utilizados, pero, dada su estructura, podría tratarse tanto de una modificación a nivel taxonómico (*i.e.*, reducción de actinobacterias y/o bacterias reductoras del sulfato) como a nivel metabólico (*i.e.*, menor proporción de estructuras ramificadas como protección ante el estrés ambiental). Esto último no implica que en las CMS de los ambientes prístinos no estén presentes microorganismos con otro tipo de estructuras adaptadas a condiciones ambientales adversas, como podría ser el grupo ciclopropilo. Otro aspecto que no mostró una alteración marcada de las CMS ante el cambio en el uso de la tierra, ni por ende tampoco una estabilización posterior, fueron los perfiles de estos PLFA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ese Capítulo sólo estudió muestras del año 2013, las cuales presentaron peculiaridades que se discutirán con posterioridad.

Por otro lado, se planteó la hipótesis de que los sucesivos años de cultivo llevarían a una adaptación de esas comunidades microbianas al ambiente edáfico agrícola y los resultados obtenidos en el Capítulo 2 apoyaron esas hipótesis. Una vez implementado el uso agrícola, las CMS parecieron atravesar un proceso tanto de homogeneización como de estabilización con los sucesivos años de cultivo. Se considera que existe un proceso de homogeneización porque hacia los ambientes de media y larga historia de cultivo es clara la reducción en la variabilidad intra-sitio y entre fincas (para una misma categoría de uso agrícola). Esto implica que, a pesar de la heterogeneidad inicial, en especial entre los ambientes prístinos de diferentes fincas, al cabo de sucesivos años de cultivo bajo el mismo manejo, las CMS se volvieron muy similares, aun cuando en algunos casos el cultivo al momento del muestreo difirió. Este resultado no se reflejó en los perfiles de PLFA pero hubiera sido necesario analizar tanto muestras de 2011 como de 2013 para corroborar que la ausencia de patrón por uso de la tierra no se trató de un artificio dado por el déficit hídrico de 2013. De hecho, la hipótesis de un proceso de homogeneización es fortalecida por el ya mencionado estudio de las comunidades bacterianas por pirosecuenciación, en el cual se encontró una clara reducción en la diversidad beta (entre sitios) con los años de cultivo. Por otro lado, la estabilización fue evidente debido a que ambientes agrícolas de diferente edad exhibieron niveles similares de biomasa microbiana, actividad hidrolítica, y, en los últimos estadios, respiración basal y específica. En concordancia con estos resultados, nuestro grupo de trabajo encontró que, al evaluar la capacidad de utilizar diversos sustratos por la técnica de CLPP con BD™ Oxygen Biosensor System, las CMS de ambientes recientemente desmontados se comportaron de manera similar a las de ambientes con 20 años de monocultivo de soja. La biomasa microbiana parecería mantenerse en un valor umbral que podría estar regulado por mecanismos de protección por parte del suelo y/o por el manejo bajo siembra directa, que podría conservar la materia orgánica y sus fracciones en esos niveles a partir del tercer año de cultivo, cuando es implementada.

Esta tesis se había planteado con la idea inicial de comparar dos muestreos realizados en la misma época del año. Sin embargo, como se menciona en reiteradas ocasiones, el muestreo de 2013 presentó grandes desafíos al haber coincidido con una etapa de déficit hídrico severo, donde las muestras se tomaron prácticamente secas y la profundidad de muestreo debió ser reducida. En el Capítulo 2, este segundo muestreo mantuvo algunas de las tendencias encontradas en muestras de 2011, pero en general las diferencias entre

ambientes se suavizaron, como en el caso de la actividad hidrolítica y la biomasa microbiana, o se modificaron drásticamente, como la respiración y el cociente metabólico. Las diferencias entre muestreos advirtieron sobre la variabilidad impuesta por las condiciones al momento del muestreo y sobre cómo pueden afectar la interpretación del fenómeno estudiado. A pesar de que las limitantes en el muestreo no permitieron desentrañar los factores determinantes de las diferencias entre 2011 y 2013 (déficit hídrico, tiempo transcurrido o profundidad de muestreo), el déficit hídrico parecería tener gran influencia sobre la estructura y la funcionalidad de las CMS. Por ejemplo, como ocurrió en el caso de la respiración basal y el cociente metabólico, que fue más elevado que en 2011 y no presentó diferencias entre ambientes. La ausencia de patrón en los perfiles de PLFA del Capítulo 3 también sugiere que hay un factor afectando a las CMS de todos los ambientes. La gran abundancia de ácidos grasos ramificados, junto con la respuesta de los perfiles de PLFA en el ensayo de estrés, en el cual el re-humedecimiento llevó a que las CMS volvieran a agruparse según su uso, sugiere que las condiciones de déficit hídrico podrían ser causantes de esa ausencia de patrón en la estructura de la comunidad microbiana viable.

El Capítulo 4 también indagó en la cronosecuencia analizada en el Capítulo 2, bajo la hipótesis de que las bacterias metanótrofas, un grupo funcional especializado en la oxidación de metano y, por ende, en la mitigación de este GEI, también se vería afectado por el cambio en el uso de la tierra y el tiempo bajo uso agrícola, tanto en abundancia como en composición (aquí estudiada como la relación entre metanótrofos de tipo I y de tipo II, *Alpha-* y *Gammaproteobacteria*, respectivamente). Esto se planteó no sólo porque se supone que las CMS van a responder sensiblemente a la modificación de su entorno, sino también porque se nos había informado de una creciente densificación de los suelos en respuesta al manejo agrícola implementado en la zona. En primer lugar, se encontró un efecto negativo del uso agrícola en la abundancia de bacterias metanótrofas totales, que en las muestras de 2011 se vio como asociada al cambio en el uso de la tierra (mayor abundancia en suelos prístinos que en cultivados) y en las de 2013 se registró como una disminución entre los suelos de 5-7 y de 30-32 años de cultivo. Dentro del grupo funcional de los metanótrofos, sólo los de tipo II respondieron al uso agrícola, aunque el efecto fue detectable tardíamente en la cronosecuencia. Es decir que, en términos de lo planteado en las hipótesis generales de la cronosecuencia (cambio drástico, estabilización y homogeneización), los metanótrofos no se ajustaron totalmente, lo cual podría estar reflejando un comportamiento característico a nivel del grupo funcional.

En relación con la composición de la comunidad metanotrófica, los resultados no fueron concluyentes y abren lugar a nuevas interrogantes. A pesar de que los metanótrofos de tipo II se mostraron más sensibles al uso agrícola, la relación tipo II:tipo I no tuvo una respuesta clara, salvando una tendencia al aumento en suelos de 3-5 años de cultivo (muestreo 2011). A pesar de que las diferencias no fueron en relación a todos los ambientes, este resultado es interesante porque se trata de sitios que mostraron un comportamiento particular en otros niveles, siempre marcando una gran sensibilidad de las CMS a los primeros años luego del cambio en el uso de la tierra. En este caso, el resultado podría relacionarse con la estrategia de vida de estos dos grupos. Contrario a lo observado y discutido en el Capítulo 2 a nivel de la comunidad microbiana, los metanótrofos de tipo II, aquí preponderantes, no son considerados copiotróficos sino más bien (aunque no estrictamente) oligotróficos, con gran capacidad de resistir y recuperarse ante un disturbio. Esta diferencia entre lo observado a nivel de comunidad y de grupo funcional podría explicarse porque aquí medimos abundancia y no actividad de metanótrofos, con lo cual esa mayor relación tipo II:tipo I podría responder a organismos

que se encuentran inactivos. De hecho, los metanótrofos de tipo II en los suelos suelen estar presentes en formas de reposo y es gracias a ese estado que pueden tolerar los disturbios o condiciones estresantes. Esto también explicaría por qué la reducción de este grupo es más bien gradual, sin diferencias entre el suelo agrícola de corta historia y el suelo de monte (en ninguno de los dos muestreos). Con los sucesivos años bajo cultivo, puede que el ambiente agrícola haya desfavorecido a los metanótrofos de tipo II, donde se adaptan mejor los microorganismos de tipo estrategias *r*. En el muestreo de 2013, la relación entre ambos tipos de metanótrofos se mantuvo constante, apoyando la idea de que las condiciones al momento del muestreo fueron influyentes. En resumen, de lo obtenido para la composición de los metanótrofos, los resultados resaltan la necesidad de nuevas líneas de investigación que permitan relacionar la estrategia de vida de ambos grupos de metanótrofos con el uso de la tierra y, por ende, aportar conocimiento a la adaptación de un grupo funcional a estos cambios. Como se mencionó en el capítulo correspondiente, un primer paso es estudiar estos grupos a partir de otro gen, como podría ser el *pmoA*, para evitar posibles problemas de especificidad asociados a la amplificación gen 16S rRNA, tal como se discutió anteriormente.

La última propuesta de esta tesis fue encarar un estudio en microcosmos para evaluar la dinámica de las CMS ante un evento estresante que fuera esperable en la zona. Para ello, en el Capítulo 5 se seleccionó una de las fincas estudiadas y se sometieron sus suelos a un ensayo de estrés hídrico. Como se mencionó anteriormente, este ensayo arrojó información interesante para enriquecer lo observado en capítulos anteriores. A pesar de que algunos resultados presentaron una alta variabilidad intra-sitio, el comportamiento de las CMS en muchos casos condice con lo esperado en base a lo visto en el Capítulo 2. Por ejemplo, en ese capítulo se concluyó que las CMS eran principalmente alteradas en los primeros años después del desmonte y en estos ensayos, esas comunidades microbianas fueron justamente las que se mostraron más frágiles, en comparación con las de suelos de monte o de larga historia agrícola, ante la ocurrencia del estrés hídrico. Esto se observó principalmente para las muestras de 2011 en biomasa y aspectos funcionales (respiración y eficiencia metabólica), pero también en 2013, especialmente en estructura de la comunidad microbiana viable. Por otro lado, en congruencia con la estabilización observada en el Capítulo 2, el ensayo de estrés hídrico sugirió que las CMS pasan por un proceso de adaptación a lo largo del tiempo bajo uso agrícola. Los ambientes con larga historia agrícola tendieron a presentar mayor resistencia y resiliencia en aspectos generales como biomasa, eficiencia metabólica y PLFA. Esa mayor estabilidad no se observó al evaluar la respuesta respiratoria al agregado de un compuesto intermediario de la degradación de la lignina, el ácido vanílico, donde fue evidente el monte no sólo presentó CMS con mayor respuesta a este sustrato, sino que proporcionalmente esta función fue más resistente al estrés hídrico. Esto fortalece la hipótesis de que funciones más específicas, a cargo de grupos microbianos más acotados, resultarían más sensibles ante un disturbio o situación estresante.

Con el ensayo de estrés buscaba inquirirse también en las diferencias observadas entre años en términos del comportamiento especial de los sitios de corta historia agrícola (3-5/5-7 años). Si la sequía estuvo relacionada con estas diferencias, entonces en el tiempo de resistencia los suelos de corta de 2011 deberían haber presentado una RE similar a los otros ambientes. Esto no se observó para el monte, pero sí para el ambiente de larga, que ante el estrés alcanzó una RE tan alta como el de corta. Esto fortalece la hipótesis de que parte de las similitudes en  $qCO_2$  entre ambientes de 2013 se explican por el déficit hídrico de esos suelos. En el caso del monte, que incrementó su RE pero no alcanzó los niveles

de los suelos agrícolas, podría suponerse que el efecto del estrés hídrico impuesto no fue tan marcado por la menor duración con respecto al déficit hídrico ocurrido a campo.

En el Capítulo 2 una de las hipótesis para explicar la mayor respiración de los suelos de 3-5 años había sido su alto contenido de C lábil. Sin embargo, en el ensayo de estrés, luego de 10 días de pre-incubación, donde se asume que se consumió buena parte del C lábil, los niveles de RB siguieron siendo superiores en el de corta que en los otros dos ambientes y los de RE (equivalente al  $qCO_2$ ) fueron tan altos como los del ambiente de larga, el cual presentó muy bajos niveles tanto de RB como de biomasa. Esto sugiere que en esa respuesta están involucrados factores metabólicos propios de la comunidad microbiana y que, en las mediciones del Capítulo 2, fueron aún más marcadas en el suelo de corta por la mayor disponibilidad de C lábil.

Siguiendo con este razonamiento, en 2013 podría haberse esperado que el suelo de corta historia supere a los otros dos en respiración basal y específica, ya que la pre-incubación podría tomarse como un período de recuperación del estrés hídrico que les había afectado en el campo. Esto no fue así en términos de RB pero sí de RE: mientras que el  $qCO_2$  no había detectado diferencias entre ambientes en el Capítulo 2, la pre-incubación parece haber restablecido en parte las relaciones entre ambientes, llevando a que los suelos agrícolas presentaran más RE que los del monte. Esto puede haber sido una compensación parcial, donde 10 días de pre-incubación no fueron suficientes para compensar el impacto de meses de déficit hídrico a campo, o bien denotar que los suelos de corta se modificaron en esos dos años y se asemejan más a los de larga. Luego de la pre-incubación los niveles de RE de 2013 siguieron siendo superiores a los de 2011 en la misma instancia, pero esto no confirma que haya una recuperación parcial porque podría ser un efecto de la profundidad de muestreo (donde en 2013 se está seleccionando una fracción más activa de la comunidad al muestrear a menor profundidad). El cambio de variable para estimar biomasa también puede haber influido en las relaciones de RE entre ambientes, en especial teniendo en cuenta lo erráticos que fueron algunos valores medidos en los suelos de larga historia de 2013 y la enorme dispersión de estos datos.

En todas las instancias de análisis, principalmente en el Capítulo 2, se propuso relacionar variables microbianas con propiedades físico-químicas de los suelos, para así obtener así una interpretación integrada de los distintos escenarios estudiados. Al relacionar estos grupos de variables se hizo evidente la complejidad de establecer relaciones claras entre ellas, ya sea a través de coeficientes de correlación o a través de análisis multivariados más complejos. Al estudiar gradientes ambientales, donde muchas variables co-varían, es difícil sacar conclusiones respecto de relaciones causa-efecto. Probablemente, si la intención es revelar los factores físico-químicos asociados a una variable microbiana en particular, sean más interesantes estudios de carácter más intensivo, como un muestreo refinado a pequeña escala, donde se reduce al máximo la influencia de otros factores no edáficos. Así podría estudiarse la interacción entre las CMS y diversos aspectos químicos y también físicos, como la porosidad y la estructura, que no fueron contemplados en esta tesis. En un estudio como éste, al comparar ambientes sumamente contrastantes, las variables físico-químicas tuvieron un valor más que nada complementario, facilitando el conocimiento del medio abiótico del cual surge cada dato microbiológico.

Los resultados obtenidos abren un abanico de posibilidades respecto de las líneas de trabajo a seguir. Luego de un estudio como éste, que describió aspectos más bien generales de las CMS, resulta interesante enfocarse en grupos funcionales que informen sobre los diferentes ciclos biogeoquímicos, integrando aspectos de estructura y función. El estudio genético de los metanótrofos de tipo I y tipo II fue un primer acercamiento que

invita análisis estructurales más profundos de éste y otros grupos funcionales, además de su relación con la expresión de los genes y la tasa de actividad en cuestión. En este sentido, el grupo de trabajo continuará indagando sobre la estructura y función de metanótrofos y metanógenos, incluyendo determinaciones de emisiones de metano *in situ*. Otro estudio que podría encararse para indagar en la relación entre la estructura y función en suelos con diferente antigüedad de uso agrícola sería inquirir en la capacidad de degradación de sustancias complejas o recalcitrantes, como podrían xenobióticos de uso frecuente en los sistemas bajo estudio. Nuestro grupo de trabajo ya está estudiando el efecto del cambio en el uso de la tierra sobre la abundancia y diversidad de *Trichoderma* spp., hongos con capacidad de biorremediación, entre otras funciones benéficas.

Los estudios apuntando a desentrañar la relación estructura-función podrían encararse no sólo de forma descriptiva sino también de manera más dinámica, como en el ensayo en microcosmos del Capítulo 5, enfocándose en la respuesta de grupos funcionales de relevancia ambiental. De la experiencia de este ensayo en microcosmos se destaca la importancia de realizar una logística meticulosa, de ser posible con técnicas *high-throughput*, teniendo en cuenta todas las alteraciones que podrían sufrir las CMS durante el ensayo. Tener en cuenta la evolución de suelos en condiciones control fue fundamental para no confundir efectos, pero también habría sido ideal contar con un control a menor temperatura (*e.g.*, 25°C) y datos de todas las variables tanto en condiciones a campo como luego de la pre-incubación (*i.e.*, PLFA, SIR-glu y SIR-van). Una propuesta a futuro es realizar estos ensayos con muestras sin disturbar, para reducir el impacto que tiene el tamizado y el pre-acondicionamiento sobre las muestras de suelo. Por último, los resultados interesantes observados a nivel de utilización de sustratos invitan a evaluar esta variable con técnicas isotópicas que permitan discriminar el consumo del sustrato agregado de otros procesos inducidos, como el *priming*. Otro campo poco explorado, en especial en la comparación de distintos suelos, es la relación entre la utilización de sustratos (o alguna otra función de interés) y la estructura de las CMS en estudios en microcosmos. Esto permitiría poner a prueba qué funciones o tipos de función (y en qué ambientes) son más susceptibles al disturbio o estrés.

Con respecto a los diferentes estadios de la cronosecuencia, los resultados de esta tesis remarcan la necesidad de un estudio en profundidad y un seguimiento temporal de los primeros años de agricultura, con foco en el ciclado del carbono y el balance de carbono en esos suelos. que contribuya a comprender cómo es la dinámica de esa respuesta temprana en las CMS. Debido a que se han reportado una reducción progresiva de la fertilidad física de esos suelos, estos estudios serían bien complementados con otros que relacionen la biomasa, estructura e incluso actividad microbiana en diferentes niveles de agregación. Conservar la estructura de los suelos a tiempo permitirá hacer un uso más eficiente del agua por parte de los cultivos, además de evitar procesos erosivos. Articulado con estos estudios, es prioritario trascender el enfoque observacional para poner a prueba diferentes estrategias de manejo post-desmante que eviten o reduzcan los efectos perjudiciales sobre las CMS. Los productores de la zona ya están evaluando alternativas de manejo que reduzcan o reviertan el daño sobre la fertilidad física y química, con lo cual se abren oportunidades para estudios de ese tipo. En zonas muy degradadas, son promisorios los estudios de reforestación con vegetación nativa que permitan hacer un seguimiento de la dinámica (cronosecuencia) y la capacidad de recuperación, como se están realizando a nivel internacional en muchos escenarios similares al estudiado en esta tesis. Por último, relacionar los fenómenos medidos en el laboratorio, de carácter potencial, con mediciones *in situ*, sería de gran valor para extrapolar los resultados obtenidos con el potencial efecto a gran escala.



## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**



**Cuadro S1.** Coeficientes de correlación de Pearson entre variables microbiológicas y físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola, muestreo 2011. *Se muestran sólo correlaciones significativas con  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).*

	Arena	Limo	Arcilla	CHS	pH	CE	CO	C lábil	N total	C:N	P ext.	C:P	K int.
CBM							0,86**		0,83**		0,69**		
RB						0,65*	0,60*	0,89**	0,62*		0,65*		
Amonificación						0,75**	0,87**		0,84**		0,77**		
AF ácida	-0,59*		0,61*				0,81**		0,78**		0,69**		
AF alcalina						0,76**	0,90**	0,66*	0,95**		0,89**		
AWCD <sub>48</sub>													
CBM:CO								-0,60*					
qCO <sub>2</sub>								0,68*					
Amon.:CBM						0,82**	0,76**		0,74**		0,80**		
AF ác.:CBM												0,58*	
AF alc.:CBM								0,59*					
AWCD <sub>48</sub> :CBM	0,83**	-0,81**	-0,70**	-0,65*			-0,86**		-0,84**		-0,73**		

**CBM:** carbono de la biomasa microbiana; **RB:** respiración basal; **AF:** actividad fosfatasa; **AWCD<sub>48</sub>:** *average well color development* (CLPP) medido a las 48 h de incubación; **qCO<sub>2</sub>:** cociente metabólico (RB:CBM); **CHS:** contenido hídrico en saturación; **CE:** conductividad eléctrica; **CO:** carbono orgánico total; **C:N:** relación carbono:nitrógeno; **C lábil:** carbono extractable (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M).

*pH, relación C:N y potasio intercambiable no presentaron correlación con ninguna de las variables microbiológicas.*

**Cuadro S2.** Coeficientes de correlación de Pearson entre variables microbiológicas y físico-químicas de suelos de una cronosecuencia agrícola, muestreo 2013. *Se muestran sólo correlaciones significativas con  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*).*

	Limo	Arcilla	pH	CE	CO	C lábil	N total	C:N	P ext.	C:P	K int.
CBM				0,52**	0,65**	0,40**	0,69**	-0,43**	0,39**		
RB				0,65**	0,71**	0,59**	0,75**	-0,42**	0,42**		
HDAF	0,33*		-0,31**	0,31*	0,48**	0,33**	0,43**				
ADH			0,70**			0,55**			-0,67**	0,53*	
SIR bruta			-0,37*	0,45**	0,48**	0,26	0,53**	-0,37*	0,42*		
SIR rta. rel.			0,63**						-0,35*		
AWCD <sub>96</sub>									-0,31*		-0,43**
CBM:CO			-0,41**								-0,27*
qCO <sub>2</sub>		-0,30*	0,44**			0,36**					
SIR rta.:CBM	0,09										
AWCD <sub>96</sub> :CBM	-0,32*			-0,46**	-0,48**	-0,22*	-0,50**	0,28*	-0,47**		

**CBM:** carbono de la biomasa microbiana; **RB:** respiración basal; **HDAF:** hidrólisis de diacetato de fluoresceína; **SIR:** respiración inducida por sustrato; **SIR rta.:** respuesta al agregado de sustrato (relativa a la actividad basal); **ADH:** actividad deshidrogenasa; **AWCD<sub>96</sub>:** *average well color development* (CLPP) medido a las 96 h de incubación; **CE:** conductividad eléctrica; **CO:** carbono orgánico total; **C lábil:** carbono extractable (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M); **C:N:** relación carbono:nitrógeno; **P ext.:** fósforo extractable; **C:P:** relación carbono:fósforo; **K int.:** potasio intercambiable.

*Contenido de arena, HDAF:CBM y ADH:CBM no presentaron correlación con otras variables.*

**Cuadro S3.** Coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia de genes de interés y las propiedades físico-químicas incluyendo ambos muestreos (2011 y 2013)

	<i>pmoA</i>	tipo I	tipo II	tipo II:I
<b>Arena</b>	-0,16	0,09	-0,22	-0,23
<b>Limo</b>	0,23	0,01	0,26	0,15
<b>Arcilla</b>	-0,06	-0,29	0,02	0,33
<b>CHS</b> <sup>1</sup>	0,18	-0,13	0,53	0,39
<b>pH</b>	-0,12	0,10	-0,19	-0,32
<b>CE</b>	0,41 *	0,35	0,41 *	-0,10
<b>CO</b>	0,69 **	0,57 **	0,74 **	-0,04
<b>C lábil</b>	0,44 *	0,73 **	0,58 **	-0,10
<b>N total</b>	0,68 **	0,62 **	0,70 **	-0,07
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> <sup>1</sup>	0,57 *	0,42	0,45	0,04
<b>C:N</b>	-0,41 *	-0,42 *	-0,36	-0,02
<b>P ext.</b>	0,08	0,27	0,26	-0,06
<b>C:P</b>	0,04	-0,16	-0,32	-0,11
<b>K int.</b>	0,24	0,12	0,09	0,04
<b>Na int.</b>	0,51 *	0,16	0,25	-0,02

**CHS:** contenido hídrico en saturación; **CE:** conductividad eléctrica; **CO:** carbono orgánico total; **C lábil:** carbono extractable (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M); **C:N:** relación carbono:nitrógeno; **P ext.:** fósforo extractable; **C:P:** relación carbono:fósforo; **K y Na int.:** potasio y sodio intercambiable.

<sup>1</sup> Coeficiente calculado con datos de 2011 únicamente.

Los asteriscos señalan correlaciones significativas con  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*)

**Cuadro S4.** Coeficientes de correlación de Pearson entre la abundancia de genes de interés y las variables físico-químicas para suelos agrícolas de ambos muestreos (2011 y 2013)

	<i>pmoA</i>	tipo I	tipo II	tipo II:I
<b>Arcilla</b>	0,07	-0,51 *	0,01	0,26
<b>CO</b>	0,51 *	0,14	0,37	0,13
<b>C lábil</b>	0,48 *	0,15	0,52 *	0,28
<b>N total</b>	0,57 *	0,15	0,40	0,13
<b>Na int.</b>	0,56 *	0,00	0,18	0,01

**CO:** carbono orgánico total; **C lábil:** carbono extractable (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M); **C:N:** relación carbono:nitrógeno; **Na int.:** sodio intercambiable.

<sup>1</sup> Coeficiente calculado con datos de 2011 únicamente.

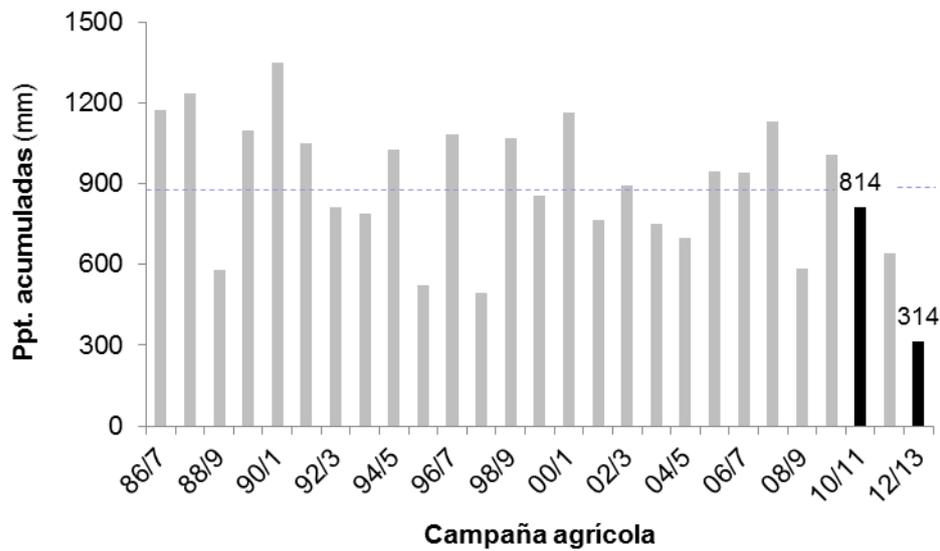
Los asteriscos señalan correlaciones significativas con  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,05$  (\*)

**Cuadro S5.** Porcentaje de variación del tratamiento de estrés hídrico con respecto al control en las variables medidas en ambos muestreos (años 2011 y 2013) para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (agro-c y agro-l, respectivamente). *Se presentan datos en cada tiempo de medición y para cada ambiente.*

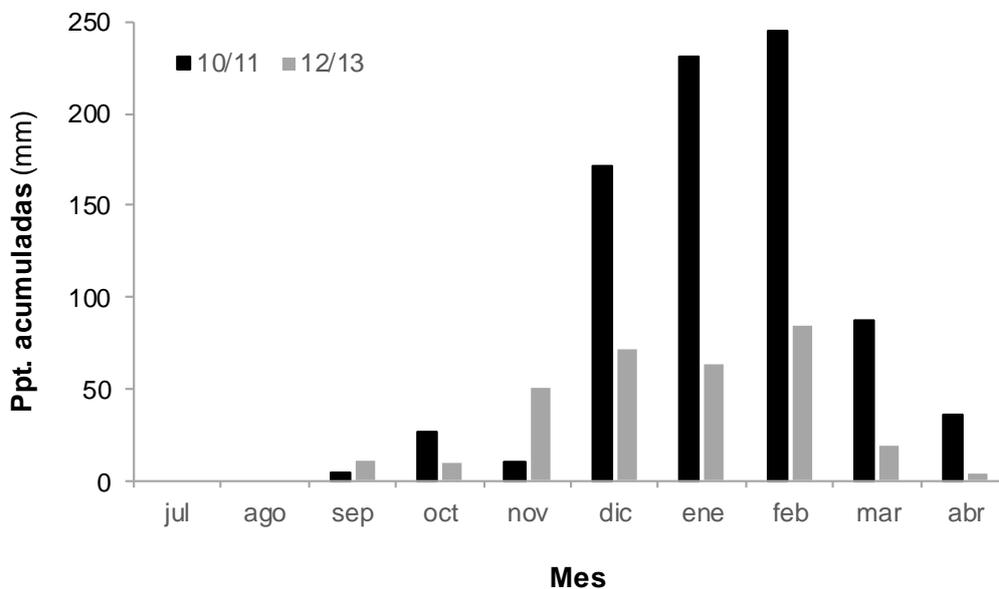
		Resistencia			Resiliencia CP			Resiliencia LP		
		monte	agro-c	agro-l	monte	agro-c	agro-l	monte	agro-c	agro-l
<b>2011</b>	BMm	-49,6 **	-42,0 **	-51,4 **	-35,4 **	-48,9 **	-30,4	14,4 *	-54,2 **	-0,3
	RB	268,0 **	193,0 **	416,7 *	14,0 *	18,5 *	50,8 *	-77,4	-50,1	44,7
	RE	679,1 **	374,4 **	759,4 **	77,3 *	128,2 **	154,7 **	-81,5	9,9	44,8
	SIR-glu	-2,5	1,3	-10,8 **	2,2 **	4,5 **	6,0 **	-37,3 **	-37,6 **	-41,8 **
<b>2013</b>	BMm	-35,4	-51,6	-33,5	5,4	-21,7	-12,3	89,3 **	14,1	142,9
	BMv	16,7	32,6 **	-10,7	27,8 *	-7,6	-22,5	-9,0	-23,0	-7,4
	Hongos	46,0 **	56,0 **	15,1	-11,3	4,0	141,4	8,7	-26,9	14,1
	RB	248,0 **	302,6 **	298,4 **	55,6	57,4	51,3	1,0	140,8	3,5
	RE	615,8 **	889,3 **	465,0 **	45,1	115,9	84,2	-56,0	159,4	-58,6
	SIR-glu	17,2 **	2,8	3,7	-2,6	-4,0	-4,0	0,1	-4,3	8,2
	SIR-van	0,1	-37,2 *	-58,1 **	2,5	-0,6	7,1	-7,1	-9,9	-11,8

**BMm:** biomasa microbiana molecular; **RB:** respiración basal; **RE:** respiración específica (RB:BMm); **SIR-glu** y **SIR-van:** respiración inducida por glucosa y ácido vanílico, respectivamente; **BMv:** biomasa microbiana viable.

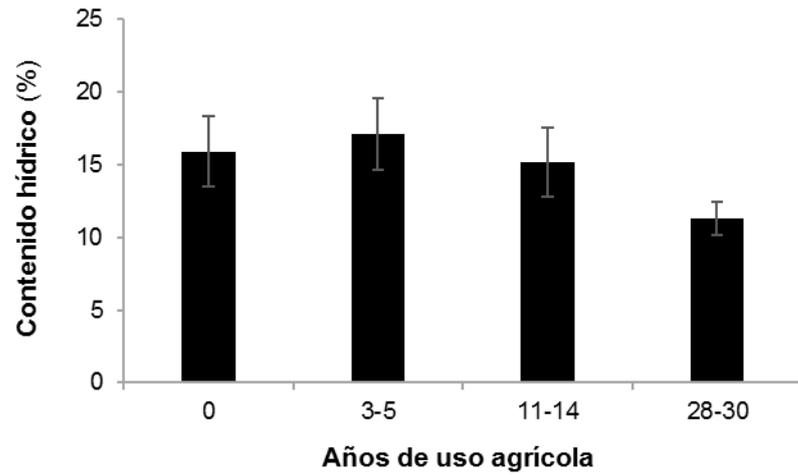
*Los asteriscos señalan diferencias significativas entre estrés y control con  $P < 0,05$  (\*) y  $P < 0,01$  (\*\*)*



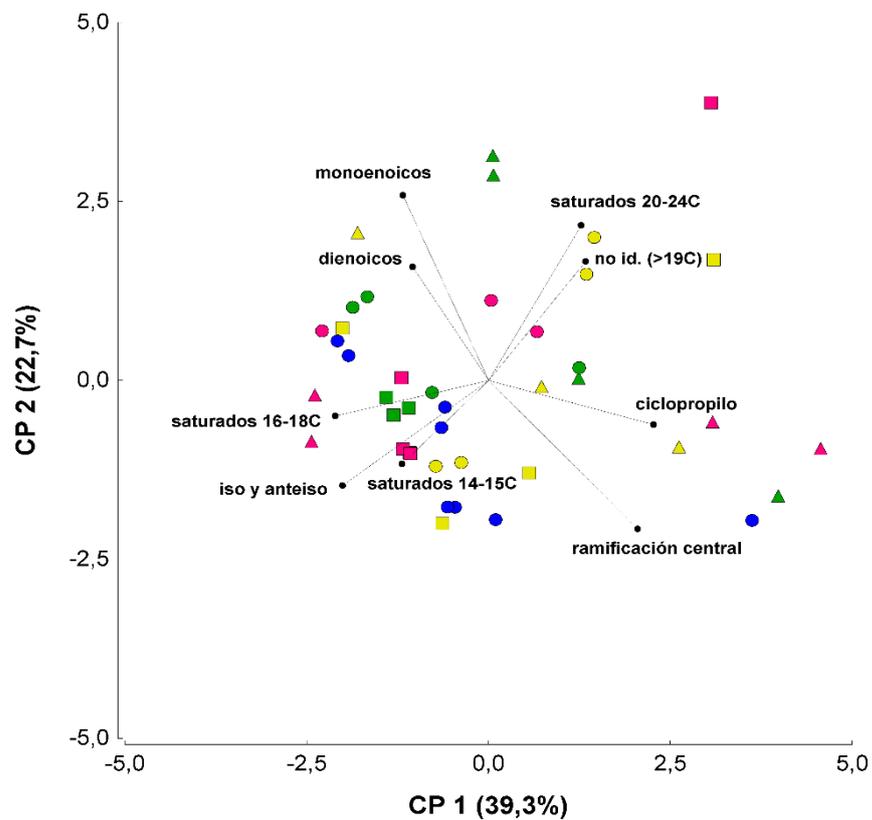
**Figura S1.** Precipitaciones (ppt.) anuales acumuladas, expresadas por campaña agrícola, en la localidad de Las Lajitas, Salta, para el período julio 1986 - junio 2013. Las barras en negro corresponden a los dos momentos de muestreo (con su respectivo rótulo en mm) y la línea punteada señala el valor promedio histórico para el período analizado. Fuente: Matías Michel, Consorcio “Los Tapires”, Las Lajitas, Salta.



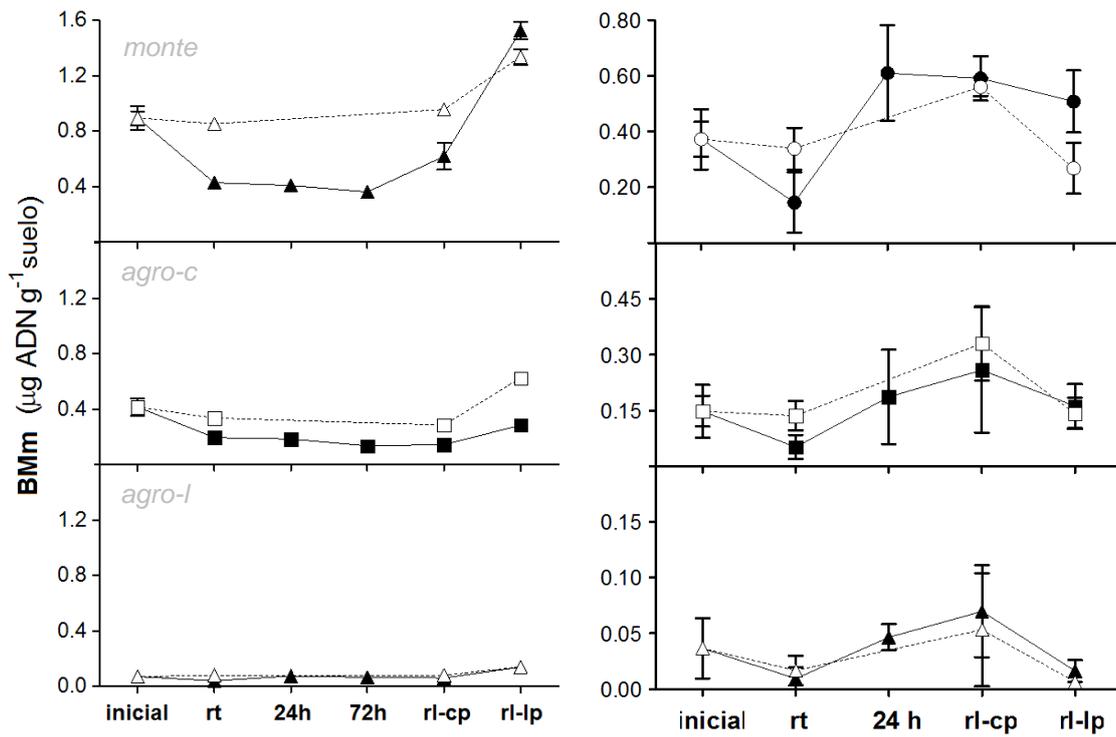
**Figura S2.** Precipitaciones (ppt.) mensuales acumuladas para las campañas 2010/11 (negro) y 2012/13 (gris) en la localidad de Las Lajitas, Salta. Fuente: Matías Michel, Consorcio “Los Tapires”, Las Lajitas, Salta.



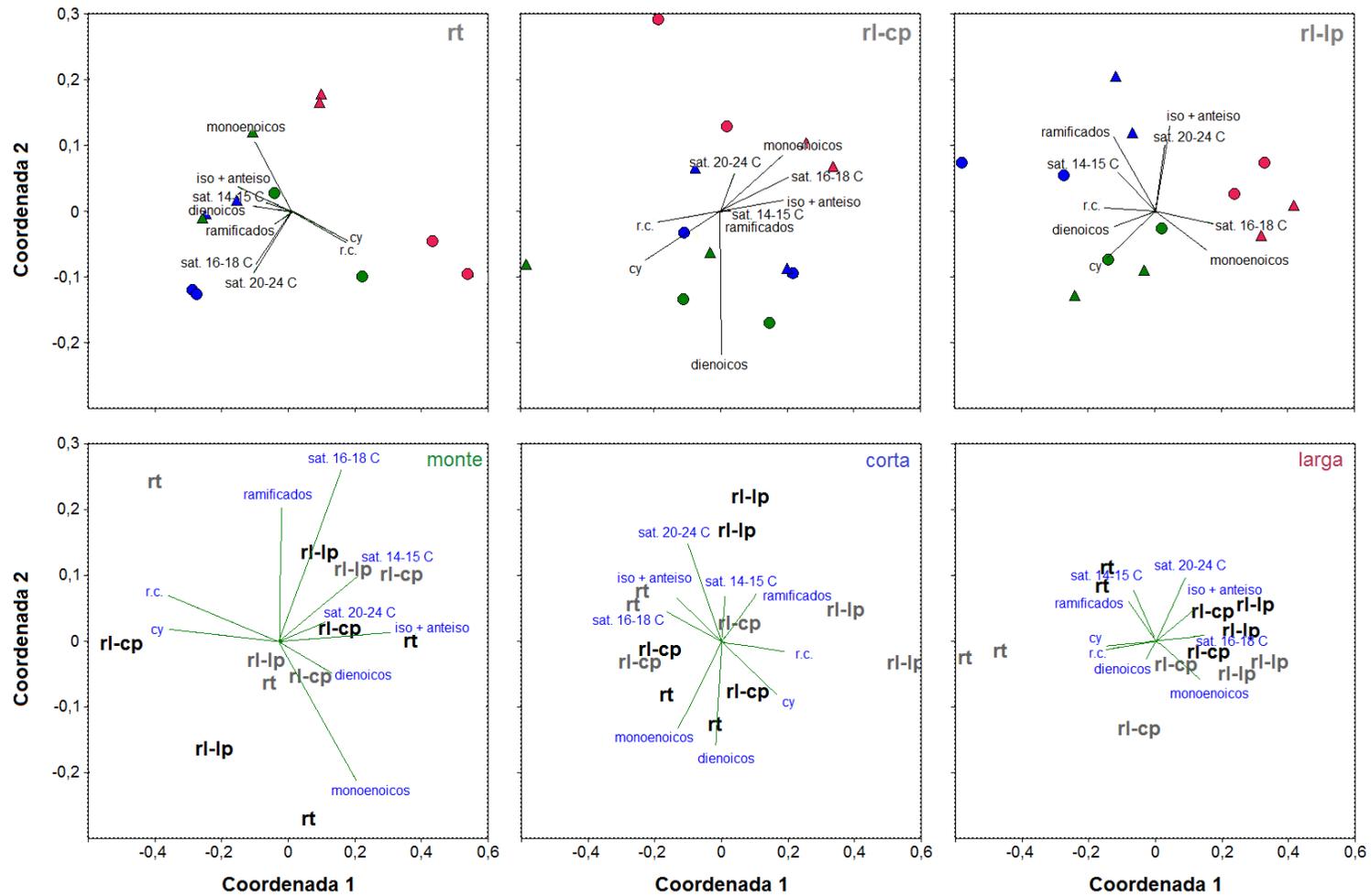
**Figura S3.** Contenido hídrico gravimétrico a campo de las muestras de suelo tomadas en 2011. En 2013 las muestras no presentaron cantidades detectables de agua (no hubo variación de peso al secarlas en estufa por 7 d). Se presentan valores promedio de 3 fincas con barras de desvío estándar.



**Figura S4.** Biplot del análisis de componentes principales evaluando la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, agrupados por estructura química, de suelos de una cronosecuencia agrícola: 0 (verde), 5-7 (azul), 13-16 (amarillo) y 30-32 (rojo) años bajo uso agrícola. Los símbolos representan las diferentes fincas (■IS, ●PC y ▲LR). No id.: ácidos grasos no identificados.



**Figura S5.** Evolución de la biomasa microbiana molecular (BMm) en los ensayos de 2011 y 2013 (izq. y der., respectivamente) para suelos de monte y suelos agrícolas de corta y larga historia (arriba, medio y abajo, respectivamente) sometidos a estrés hídrico (negro) y controles (blanco). Los gráficos incluyen las mediciones complementarias realizadas en suelos estresados a las 24 y/o 72 horas del rehumedecimiento. *Las barras corresponden al desvío estándar.*



**Figura S6.** NMDS (*non-metric multidimensional scaling*) de los perfiles de PLFA de la Figura 34 con superposición de las distintas estructuras químicas de ácidos grasos. A) los distintos tiempos de medición y B) los distintos ambientes evaluados. En A: **verde:** monte, **azul:** agrícola de corta historia (agro-c), **rojo:** agrícola de larga historia (agro-l); **triángulos:** estrés, **círculos:** control. En B: **rt:** resistencia, **rl-cp:** resiliencia a corto plazo, **rl-lp:** resiliencia a largo plazo; **negro:** estrés, **gris:** control. *r.c.:* con ramificación central; *sat.:* saturados lineales; *cy:* con grupo ciclopropilo; *iso* y *anteiso*.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abril, A.B., y E.H. Bucher. 2008. Variation in soil biological characteristics on an elevational gradient in the montane forest of north-west Argentina. *J. Trop. Ecol.* 24(4): 457–461.
- Achard, F., R. Beuchle, P. Mayaux, H.J. Stibig, C. Bodart, A. Brink, S. Carboni, B. Desclée, F. Donnay, H.D. Eva, A. Lupi, R. Raši, R. Seliger, y D. Simonetti. 2014. Determination of tropical deforestation rates and related carbon losses from 1990 to 2010. *Glob. Chang. Biol.* 20(8): 2540–2554.
- Acosta-Martínez, V., L. Cruz, D. Sotomayor-Ramírez, y L. Pérez-Alegría. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Appl. Soil Ecol.* 35(1): 35–45.
- Acreche, M.M., R. Portocarrero, J. Chalco Vera, C. Danert, y A.H. Valeiro. 2014. Greenhouse Gas Emissions from Green-Harvested Sugarcane With and Without Post-harvest Burning in Tucumán, Argentina. *Sugar Tech* 16(2): 195–199.
- Alef, K. 1995a. Soil Respiration. p. 214–216. En: Alef, K., Nannipieri, P. (eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Alef, K. 1995b. Nitrogen mineralization in soils. p. 234–2434. En: Alef, K., Nannipieri, P. (eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Alef, K. 1995c. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. p. 232–234. En: Alef, K., Nannipieri, P. (eds.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- An, S., F. Zheng, F. Zhang, S. Van Pelt, U. Hamer, y F. Makeschin. 2008. Soil quality degradation processes along a deforestation chronosequence in the Ziwuling area, China. *Catena* 75(3): 248–256.
- Anderson, T.H., y K.H. Domsch. 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biol. Biochem.* 42(12): 2039–2043.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98: 285–293.
- Anderson, T.H., y K.H. Domsch. 1990. Application of eco-physiological quotients ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biol. Biochem.* 22(2): 251–255.
- Anderson, J., y K. Domsch. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10(3): 215–221.
- Angel, R., P. Claus, y R. Conrad. 2012. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J.* 6(4): 847–62.
- Aronson, E.L., S.D. Allison, y B.R. Helliker. 2013. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. *Front. Microbiol.* 4: 1–15.
- Bååth, E., y T.H. Anderson. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol. Biochem.* 35(7): 955–963.
- Bach, E.M., S.G. Baer, C.K. Meyer, y J. Six. 2010. Soil texture affects soil microbial and structural recovery during grassland restoration. *Soil Biol. Biochem.* 42(12): 2182–2191.
- Bahr, E., D. Chamba Zaragocin, y F. Makeschin. 2014. Soil nutrient stock dynamics and land-use management of annuals, perennials and pastures after slash-and-burn in the Southern Ecuadorian Andes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 188: 275–288.
- Bailey, V.L., A.D. Peacock, J.L. Smith, y J. Bolton. 2002. Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate-induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 34(9): 1385–1389.
- Banning, N.C., y D. V. Murphy. 2008. Effect of heat-induced disturbance on microbial biomass and activity in forest soil and the relationship between disturbance effects and microbial community structure. *Appl. Soil Ecol.* 40(1): 109–119.
- Bastida, F., A. Zsolnay, T. Hernández, y C. García. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147(3–4): 159–171.
- Becerra, A., M. Cabello, y F. Chiarini. 2007. Arbuscular mycorrhizal colonization of vascular plants from the Yungas forests, Argentina. *Ann. For. Sci.* 64: 765–772.
- Bérard, A., T. Bouchet, G. Sévenier, A.L. Pablo, y R. Gros. 2011. Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. *Eur. J. Soil Biol.* 47(6): 333–342.
- Birch, H. 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant Soil* 10(1): 9–31.
- Bissett, A., M. V. Brown, S.D. Siciliano, y P.H. Thrall. 2013. Microbial community responses to

- anthropogenically induced environmental change: Towards a systems approach. *Ecol. Lett.* 16(1): 128–139.
- Bissett, A., A. Richardson, G. Baker, y P.H. Thrall. 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Appl. Soil Ecol.* 51: 66–78.
- Blagodatskaya, E., y Y. Kuzyakov. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biol. Biochem.* 67: 192–211.
- Blagodatskaya, E., y Y. Kuzyakov. 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol. Fertil. Soils* 45(2): 115–131.
- Bligh, E., y W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37(8): 911–917.
- Bloem, J., A.J. Schouten, S.J. Sørensen, M. Rutgers, A. van der Welf, y A.M. Breure. 2006. Monitoring and evaluating soil quality. p. 73–77. En: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (eds.), *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI.
- Bodelier, P. 2011. Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Front. Microbiol.* 2: 80.
- Bodelier, P.L., P. Roslev, T. Henckel, y P. Frenzel. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403(6768): 421–424.
- Bossio, D.A., M.S. Girvan, L. Verchot, J. Bullimore, T. Borelli, A. Albrecht, K.M. Scow, A.S. Ball, J.N. Pretty, y A.M. Osborn. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of western Kenya. *Microb. Ecol.* 49(1): 50–62.
- Bossio, D.A., y K.M. Scow. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.* 35(3): 265–278.
- Bossio, D., K.M. Scow, N. Gunapala, y K. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* 36: 1–12.
- Brackin, R., N. Robinson, P. Lakshmanan, y S. Schmidt. 2013. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 57: 68–77.
- Bremer, E., y P. Kuikman. 1994. Microbial utilization of <sup>14</sup>C glucose in soil is affected by the amount and timing of glucose additions. *Soil Biol. Biochem.* 26(4): 511–517.
- Brown, A.D., P.G. Blendinger, T. Lomáscolo, y P. García Bes. 2009. *Selva pedemontana de las Yungas: historia natural, ecología y manejo de un ecosistema en peligro*. Ediciones del Subtrópico, Buenos Aires, Argentina.
- Brown, A.D., U. Martínez Ortiz, M. Acerbi, y J. Corcuera. 2006. *La situación ambiental argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina.
- Brown, A.D., y L.R. Malizia. 2004. Las Selvas Pedemontanas de las Yungas. *Cienc. Hoy* 14(83): 52–63.
- Brussaard, L. 2012. Ecosystem services provided by the soil biota. p. 45–58. En: Wall, D.H., Bardgett, R.D., Behan-Pelletier, V., Herrick, J.E., Jones, T.H., Six, J., Strong, D.R. (eds.), *Soil Ecology and Ecosystem Services*. Oxford University Press.
- Buckeridge, K.M., S. Banerjee, S.D. Siciliano, y P. Grogan. 2013. The seasonal pattern of soil microbial community structure in mesic low arctic tundra. *Soil Biol. Biochem.* 65: 338–347.
- Burges, N.A., H.M. Hurst, y B. Walkden. 1964. The phenolic constituents of humic acid and their relation to the lignin of the plant cover. *Geochim. Cosmochim. Acta* 28(10): 1547–1554.
- Cai, Y., Y. Zheng, P. Bodelier, R. Conrad, y Z. Jia. 2016. Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. *Nat. Commun.* 7.
- Campbell, C.D., S.J. Grayston, y D.J. Hirst. 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30: 33–41.
- Campos, A.C., J.B. Etchevers, K.L. Oleschko, y C.M. Hidalgo. 2014. Soil microbial biomass and nitrogen mineralization rates along an altitudinal gradient on the Cofre de Perote volcano (Mexico): the importance of landscape position and land use. *L. Degrad. Dev.* 25(6): 581–593.
- Chaer, G., M. Fernandes, D. Myrold, y P. Bottomley. 2009a. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb. Ecol.* 58(2): 414–424.

- Chaer, G.M., M.F. Fernandes, D.D. Myrold, y P.J. Bottomley. 2009b. Shifts in Microbial Community Composition and Physiological Profiles across a Gradient of Induced Soil Degradation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73(4): 1327–1334.
- Chapman, S., y T. Gray. 1986. Importance of cryptic growth, yield factors and maintenance energy in models of microbial growth in soil. *Soil Biol. Biochem.* 18(1): 1–4.
- Chowdhury, T.R., y R.P. Dick. 2012. Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 88(2): 285–291.
- Conrad, R. 2009. The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* 1(5): 285–292.
- Correa, O.S., M.S. Montecchia, M.F. Berti, M.C. Fernández Ferrari, N.L. Pucheu, N.L. Kerber, y A.F. García. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* 41(2): 185–194.
- Cosentino, D., C. Chenu, y Y. Le Bissonnais. 2006. Aggregate stability and microbial community dynamics under drying-wetting cycles in a silt loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 38(8): 2053–2062.
- Costello, A.M., y M.E. Lidstrom. 1999. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 5066–5074.
- da Silva, D.K.A., N. de Oliveira Freitas, R.G. de Souza, F.S.B. da Silva, A.S.F. de Araujo, y L.C. Maia. 2012. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil. *Geoderma* 189–190: 257–261.
- Degens, B.P., y J.A. Harris. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 29 (9): 1309–1320.
- Degens, B.P., L.A. Schipper, G.P. Sparling, y L.C. Duncan. 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biol. Biochem.* 33(9): 1143–1153.
- Denef, K., J. Six, H. Bossuyt, S.D. Frey, E.T. Elliott, R. Merckx, y K. Paustian. 2001. Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter and microbial community dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1599–1611.
- Degens, B.P., L.A. Schipper, G.P. Sparling, y M. Vojvodic-Vukovic. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 32(2): 189–196.
- Deng, H. 2012. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know? *J. Environ. Sci.* 24(6): 1027–1035.
- Deng, S.P., y M.A. Tabatabai. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biol. Fertil. Soils* 24: 141–146.
- Dequiedt, S., N.P.A. Saby, M. Lelievre, C. Jolivet, J. Thioulouse, B. Toutain, D. Arrouays, A. Bispo, P. Lemanceau, y L. Ranjard. 2011. Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20(4): 641–652.
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. Robledo. 2014. Infostat.
- Dinesh, R., S. Ghoshal Chaudhuri, A.N. Ganeshamurthy, y C. Dey. 2003. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation in wet tropical forests. *Appl. Soil Ecol.* 24(1): 17–26.
- Dini-Andreote, F., M. de Cássia Pereira e Silva, X. Triadó-Margarit, E.O. Casamayor, J.D. van Elsas, y J. Falcão Salles. 2014. Dynamics of bacterial community succession in a salt marsh chronosequence: evidences for temporal niche partitioning. *ISME J.* 8(10): 1989–2001.
- Dominy, C.S., R.J. Haynes, y R. Van Antwerpen. 2002. Loss of soil organic matter and related soil properties under long-term sugarcane production on two contrasting soils. *Biol. Fertil. Soils* 36: 350–356.
- Don, A., J. Schumacher, y A. Freibauer. 2011. Impact of tropical land use change on soil organic carbon stocks - a meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 17(4): 1658–1670.
- Doran, J.W., y M.R. Zeiss. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 15: 3–11.
- Dörr, N., B. Glaser, y S. Kolb. 2010. Methanotrophic communities in brazilian ferralsols from

- naturally forested, afforested, and agricultural Sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(4): 1307–1310.
- Drenovsky, R.E., K.L. Steenwerth, L.E. Jackson, y K.M. Scow. 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19(1): 27–39.
- Drenovsky, R.E., G.N. Elliott, K.J. Graham, y K.M. Scow. 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 36(11): 1793–1800.
- Eilers, K., C. Lauber, R. Knight, y N. Fierer. 2010. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. *Soil Biol. Biochem.* 42(6): 896–903.
- Eleftheriadis, A., y M.B. Turrión. 2014. Soil microbiological properties affected by land use, management, and time since deforestations and crop establishment. *Eur. J. Soil Biol.* 62: 138–144.
- Elena, H. 2012. Adecuación a un SIG de las cartas de suelos del Valle de Lerma - Salta. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu. <http://inta.gob.ar/>.
- Eller, G., S. Stubner, y P. Frenzel. 2001. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 198: 91–97.
- Esperschütz, J., A. Gattinger, P. Mäder, M. Schloter, y A. Fließbach. 2007. Response of soil microbial biomass and community structures to conventional and organic farming systems under identical crop rotations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61(1): 26–37.
- Falchini, L., N. Naumova, P. Kuikman, y J. Bloem. 2003. CO<sub>2</sub> evolution and denaturing gradient gel electrophoresis profiles of bacterial communities in soil following addition of low molecular weight substrates to simulate. *Soil Biol.* 35(6): 775–782.
- Feigl, B.J., C.E.P. Cerri, C.C. Cerri, y M.C. Piccolo. 2008. Microbial Biomass in Native Amazonian Ecosystems and its Adaptation to Deforestation and Pasture Introduction and Management. p. 247–264. En: Randall W. Myster (ed.), *Post-Agricultural Succession in the Neotropics*. Springer, New York.
- Fernandes, M.F., J. Saxena, y R.P. Dick. 2013. Comparison of Whole-Cell Fatty Acid (MIDI) or Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Extractants as Biomarkers to Profile Soil Microbial Communities. *Microb. Ecol.* 66(1): 145–157.
- Fierer, N., M.A. Bradford, y R.B. Jackson. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88(6): 1354–1364.
- Fierer, N., y J.P. Schimel. 2002. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biol. Biochem.* 34(6): 777–787.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2012. *State of the World's Forests*. FAO, Rome.
- Frazão, L.A., M.D.C. Piccolo, B.J. Feigl, C.C. Cerri, y C.E.P. Cerri. 2010. Inorganic nitrogen, microbial biomass and microbial activity of a sandy Brazilian Cerrado soil under different land uses. *Agric. Ecosyst. Environ.* 135(3): 161–167.
- Freedman, Z., y D.R. Zak. 2015. Soil bacterial communities are shaped by temporal and environmental filtering: evidence from a long-term chronosequence. *Environ. Microbiol.* (August).
- Frey, B., P. Niklaus, J. Kremer, y P. Lüscher. 2011. Heavy-machinery traffic impacts methane emissions as well as methanogen abundance and community structure in oxic forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(17): 6060–6068.
- Frostegård, Å., A. Tunlid, y E. Bååth. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biol. Biochem.* 43(8): 1621–1625.
- Frostegård, A., A. Tunlid, y E. Bååth. 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.* 28(1): 55–63.
- Frostegård, A., E. Bååth, y A. Tunlio. 1993a. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25(6): 723–730.
- Frostegård, A., A. Tunlid, y E. Bååth. 1993b. Phospholipid Fatty Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from Two Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy Metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11): 3605–17.
- Garland, J.L. 1999. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. In *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for

- Microbial Ecology, Halifax, Canadá.
- Garland, J.L., y A.L. Mills. 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities Based on Patterns of Community-level Sole Carbon-source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8): 2351–2359.
- Gasparri, N.I., y H.R. Grau. 2009. Deforestation and fragmentation of Chaco dry forest in NW Argentina (1972–2007). *For. Ecol. Manage.* 258(6): 913–921.
- Gasparri, N.I., H.R. Grau, y E. Manghi. 2008. Carbon pools and emissions from deforestation in extra-tropical forests of northern Argentina between 1900 and 2005. *Ecosystems* 11: 1247–1261.
- Gil-Sotres, F., C. Trasar-Cepeda, M.C. Leirós, y S. Seoane. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37(5): 877–887.
- Giuffré, L., R. Romaniuk, M. Conti, y N. Bartoloni. 2006. Multivariate evaluation by quality indicators of no-tillage system in Argiudolls of rolling pampa (Argentina). *Biol. Fertil. Soils* 42(6): 556–560.
- Gomez, E. del V, y O. Correa. 2015. Calidad de Suelos: un enfoque biológico. p. 491–524. En: Moura Brasil do Amaral, S., Chagas, C., Zonta, E. (eds.), *Impactos ambientais Provenientes da Produção Agrícola: Experiências Argentinas e Brasileiras - Parte 4: Degradação Biológica de Agroecossistemas.*
- Gomez, E., J. Garland, y M. Conti. 2004. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26(1): 21–30.
- Gomez, E., V. Bisaro, y M. Conti. 2000. Potential C-source utilization patterns of bacterial communities as influenced by clearing and land use in a vertic soil of Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 15: 273–281.
- Gordon, H., P.M. Haygarth, y R.D. Bardgett. 2008. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biol. Biochem.* 40(2): 302–311.
- Grau, H., N. Gasparri, y T. Aide. 2005. Agriculture expansion and deforestation in seasonally dry forests of north-west Argentina. *Environ. Conserv.* 32(2): 140–148.
- Griffiths, B.S., y L. Philippot. 2012. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* 37(2): 112–129.
- Griffiths, R.I., A.S. Whiteley, G. Anthony, O. Donnell, M.J. Bailey, y A.G.O. Donnell. 2003. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 6961–6968.
- Griffiths, B.S., K. Ritz, R. Wheatley, H.L. Kuan, B. Boag, S. Christensen, F. Ekelund, S.J. Sørensen, S. Muller, y J. Bloem. 2001. An examination of the biodiversity - ecosystems function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 33: 1713–1722.
- Griffiths, B.S., K. Ritz, R.D. Bardgett, R. Cook, S. Christensen, F. Ekelund, S.J. Sorensen, E. Baath, J. Bloem, P.C. de Ruiter, J. Dolfing, y B. Nicolardot. 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90(2): 279–294.
- Hammer, Ø., D.A.T. Harper, y P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1): 9.
- Hedrick, D.B., A.D. Peacock, y D.C. White. 2007. Lipid analyses for viable microbial biomass, community composition, metabolic status, and in situ metabolism. p. 112–125. En: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., Stetzenbach, L.D. (eds.), *Manual of Environmental Microbiology.* Third. ASM Press, Washington DC.
- Henrot, J., y G.P. Robertson. 1994. Vegetation removal in two soils of the humid tropics: effect on microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 26(1): 111–116.
- Herman, D., y R. Maier. 2009. Consequences of biogeochemical cycles gone wild. p. 319–333. En: *Environmental Microbiology.* Elsevier.
- Ho, A., E. van den Brink, A. Reim, S.M.B. Krause, y P.L.E. Bodelier. 2016. Recurrence and frequency of disturbance have cumulative effect on methanotrophic activity, abundance, and community structure. *Front. Microbiol.* 6: 1–10.
- Ho, A., A. El-Hawwary, S.Y. Kim, M. Meima-Franke, y P. Bodelier. 2015. Manure-associated stimulation of soil-borne methanogenic activity in agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils* 51(4): 511–516.

- Ho, A., F.M. Kerckhof, C. Luke, A. Reim, S. Krause, N. Boon, y P.L.E. Bodelier. 2013. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. *Environ. Microbiol. Rep.* 5(3): 335–345.
- Horz, H.P., A.S. Raghubanshi, J. Heyer, C. Kammann, R. Conrad, y P.F. Dunfield. 2002. Activity and community structure of methane-oxidising bacteria in a wet meadow soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41(3): 247–257.
- Hothorn, T., F. Bretz, y P. Westfall. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical J.* 50(3): 346–363.
- Huang, Y.Z., y M. Zhong. 2015. Influence of elevated ozone concentration on methanotrophic bacterial communities in soil under field condition. *Atmos. Environ.* 108: 59–66.
- Hueso, S., T. Hernández, y C. García. 2011. Resistance and resilience of the soil microbial biomass to severe drought in semiarid soils: The importance of organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* 50(1): 27–36.
- Insam, H., y K.H. Domsch. 1988. Relationship between Soil Organic-Carbon and Microbial Biomass on Chronosequences of Reclamation Sites. *Microb. Ecol.* 15(2): 177–188.
- International Organization for Standardization. 1997. Soil quality: Determination of soil microbial biomass -- Part 2: Fumigation-extraction method.
- Irvine, I.C., L. Vivanco, P.N. Bentley, y J.B.H. Martiny. 2012. The effect of nitrogen enrichment on C1-cycling microorganisms and methane flux in salt marsh sediments. *Front. Microbiol.* 3: 1–10.
- Isermeyer, H. 1952. Estimation of soil respiration in closed jars. *Method Appl. Soil Microbiol. Biochem.*: 214–216.
- Islam, K., y R. Weil. 2000. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. *Agric. Ecosyst. Environ.* 79(1): 9–16.
- Jangid, K., M.A. Williams, A.J. Franzluebbers, T.M. Schmidt, D.C. Coleman, y W.B. Whitman. 2011. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 43(10): 2184–2193.
- Joergensen, R., y F. Wichern. 2008. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40(12): 2977–2991.
- Joergensen, R.G. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the kEC value. *Soil Biol. Biochem.* 28: 25–31.
- Juottonen, H., A. Hynninen, M. Nieminen, T.T. Tuomivirta, E.S. Tuittila, H. Nousiainen, D.K. Kell, K. Yrjälä, A. Tervahauta, y H. Fritze. 2012. Methane-cycling microbial communities and methane emission in natural and restored peatlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(17): 6386–6389.
- Kaiser, C., A. Frank, B. Wild, M. Koranda, y A. Richter. 2010. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2w6,9 and 18:1w9. *Soil Biol. Biochem.* 42(9): 1650–1652.
- Kandeler, E. 2015. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their functions. p. 187–226. En: Paul, E.A. (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. 4th ed. Academic Press.
- Kandeler, E. 1996. Nitrogen mineralization. p. 135–143. En: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (eds.), *Methods in soil biology*. Springer-Verlag.
- Kaschuk, G., O. Alberton, y M. Hungria. 2010. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biol. Biochem.* 42(1): 1–13.
- Kieft, T.L., E. Wilch, K.O. Connor, y D.B. Ringelberg. 1997. Survival and phospholipid fatty acid profiles of surface and subsurface bacteria in natural sediment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4): 1531–1542.
- Kieft, T., D. Ringelberg, y D. White. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(9): 3292–3299.
- Kieft, T. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biol. Biochem.* 19(2): 119–126.
- Kirkby, C., A. Richardson, L. Wade, J. Passioura, G. Batten, C. Blanchard, y J. Kirkegaard. 2014. Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 68: 402–409.

- Kimetu, J.M., J. Lehmann, S.O. Ngoze, D.N. Mugendi, J.M. Kinyangi, S. Riha, L. Verchot, J.W. Recha, y A.N. Pell. 2008. Reversibility of soil productivity decline with organic matter of differing quality along a degradation gradient. *Ecosystems* 11(5): 726–739.
- Knief, C. 2015. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Front. Microbiol.* 6.
- Kolb, S., C. Knief, S. Stubner, y R. Conrad. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5): 2423–2429.
- Krause, S., C. Lüke, y P. Frenzel. 2012. Methane source strength and energy flow shape methanotrophic communities in oxygen–methane counter-gradients. *Environ. Microbiol.* 4(2): 203–208.
- Kuan, H.L., C. Fenwick, L.A. Glover, B.S. Griffiths, y K. Ritz. 2006. Functional resilience of microbial communities from perturbed upland grassland soils to further persistent or transient stresses. *Soil Biol. Biochem.* 38(8): 2300–2306.
- Kuramae, E.E., H.A. Gamper, E. Yergeau, Y.M. Piceno, E.L. Brodie, T.Z. Desantis, G.L. Andersen, J.A. van Veen, y G.A. Kowalchuk. 2010. Microbial secondary succession in a chronosequence of chalk grasslands. *ISME J.* 4(5): 711–715.
- Lammel, D.R., B.J. Feigl, C.C. Cerri, y K. Nüsslein. 2015a. Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian Soils. *Front. Microbiol.* 6: 1–14.
- Lammel, D.R., K. Nüsslein, S.M. Tsai, y C.C. Cerri. 2015b. Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and Cerrado (Brazilian Savannah) biomes in Southern Amazonia. *Eur. J. Soil Biol.* 66: 32–39.
- Le Mer, J., y P. Roger. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.* 37(1): 25–50.
- Lechevalier, M. 1989. Lipids in bacterial taxonomy. p. 455–561. En: O’Leary, W.M. (ed.), *Practical handbook of microbiology*. CRC. Boca Raton, Fla.
- Leirós, M.C., C. Trasar-Cepeda, S. Seoane, y F. Gil-Sotres. 2000. Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): General parameters. *Soil Biol. Biochem.* 32: 733–745.
- Lemenih, M., E. Karlton, y M. Olsson. 2005. Assessing soil chemical and physical property responses to deforestation and subsequent cultivation in smallholders farming system in Ethiopia. *Agric. Ecosyst. Environ.* 105(1): 373–386.
- Levine, U.Y., T.K. Teal, G.P. Robertson, y T.M. Schmidt. 2011. Agriculture’s impact on microbial diversity and associated fluxes of carbon dioxide and methane. *ISME J.* 5(10): 1683–1691.
- Lin, Q., y P. Brookes. 1999. An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1969–1983.
- Liu, Q., S. Wang, H. Piao, y Z. Ouyang. 2003. The changes in soil organic matter in a forest-cultivation sequence traced by stable carbon isotopes. *Aust. J. Soil Res.* 41(7): 1317–1327.
- Lundquist, E.J., K.M. Scow, L.E. Jackson, S.L. Uesugi, y C.R. Johnson. 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biol. Biochem.* 31(12): 1661–1675.
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). 2016. Datos abiertos Agroindustria. <http://datos.magyp.gob.ar/>.
- Malizia, L., S. Pacheco, C. Blundo, y A. Brown. 2012. Caracterización altitudinal, uso y conservación de las Yungas Subtropicales de Argentina. *Ecosistemas* 21(1–2): 53–73.
- Margesin, R. 2005. Determination of enzyme activities in contaminated soil. p. 309–319. In Margesin, R., Schinner, F. (eds.), *Manual for soil analysis - Monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer.
- Margesin, R., y F. Schinner. 1989. *Manual of Soil Analysis*.
- Meisner, A., J. Rousk, y E. Bååth. 2015. Prolonged drought changes the bacterial growth response to rewetting. *Soil Biol. Biochem.* 88: 314–322.
- Melo, V.S., T. Desjardins, J.L. Silva, E.R. Santos, M. Sarrazin, y M.M.L.S. Santos. 2012. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. *Soil Use Manag.* 28: 530–535.

- Moebius-Clune, B.N., H.M. van Es, O.J. Idowu, R.R. Schindelbeck, J.M. Kimetu, S. Ngoze, J. Lehmann, y J.M. Kinyangi. 2011. Long-term soil quality degradation along a cultivation chronosequence in western Kenya. *Agric. Ecosyst. Environ.* 141(1): 86–99.
- Monaco, S., D. Hatch, D. Sacco, y C. Bertora. 2008. Changes in chemical and biochemical soil properties induced by 11-yr repeated additions of different organic materials in maize-based forage systems. *Soil Biol. Biochem.* 40(3): 608–615.
- Monreal, C.M., y D.W. Bergstrom. 2000. Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. *Can. J. Soil Sci.* 80(3): 419–428.
- Montecchia, M.S., M. Tosi, M.A. Soria, J.A. Vogrig, O. Sydorenko, y O.S. Correa. 2015. Pyrosequencing Reveals Changes in Soil Bacterial Communities after Conversion of Yungas Forests to Agriculture. *PLoS One* 10(3): e0119426.
- Montecchia, M.S., O.S. Correa, M.A. Soria, S.D. Frey, A.F. García, y J.L. Garland. 2011. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 47(3): 176–183.
- Moore-Kucera, J., y R.P. Dick. 2008. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microb. Ecol.* 55(3): 500–511.
- Murty, D., M. Kirschbaum, R.E. McMurtrie, y A. McGilvray. 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Glob. Chang. Biol.* 8(2): 105–123.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, y J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853–8.
- Nannipieri, P., y E. Paul. 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biol. Biochem.* 41(12): 2357–2369.
- Nannipieri, P., L. Giagnoni, L. Landi, y G. Renella. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. p. 215–243. En: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds.), *Phosphorus in action*. Springer Berlin Heidelberg.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, y G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54(4): 655–670.
- Navarrete, A., E. Kuramae, M. de Hollander, A. Pijl, J. van Veen, y S. Tsai. 2013. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83(3): 607–621.
- Nazaries, L., J.C. Murrell, P. Millard, L. Baggs, y B.K. Singh. 2013. Methane, microbes and models: Fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environ. Microbiol.* 15(9): 2395–2417.
- Neill, C., M.C. Piccolo, C.C. Cerri, P.A. Steudler, J.M. Melillo, y M. Brito. 1997. Net nitrogen mineralization and net nitrification rates in soils following deforestation for pasture across the southwestern Brazilian Amazon Basin landscape. *Oecologia* 110(2): 243–252.
- Neill, C., M. Piccolo, P. Steudler, J. Melillo, B. Feigl, y C. Cerri. 1995. Nitrogen dynamics in soils of forest and active pastures in the western Brazilian Amazon Basin. *Soil Biol. Biochem.* 27(9): 1167–1175.
- Nichols, P.D., J.B. Guckert, y D.C. White. 1986. Determination of monosaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *J. Microbiol. Methods* 5(1): 49–55.
- Nielsen, P., y S.O. Petersen. 2000. Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 32(8–9): 1241–1249.
- Noe, L., y A. Abril. 2013. Is the nitrification a redundant process in arid regions? Activity, abundance and diversity of nitrifier microorganisms. *Rev. Chil. Hist. Nat* 86: 325–335.
- Nogueira, M.A., U.B. Albino, O. Brandão-Junior, G. Braun, M.F. Cruz, B.A. Dias, R.T.D. Duarte, N.M.R. Gioppo, P. Menna, J.M. Orlandi, M.P. Raimam, L.G.L. Rampazo, M.A. Santos, M.E.Z. Silva, F.P. Vieira, J.M.D. Torezan, M. Hungria, y G. Andrade. 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115(1–4): 237–247.
- Nunes, J.S., A.S.F. Araujo, L.A.P.L. Nunes, L.M. Lima, R.F. V Carneiro, A.A.C. Salviano, y S.M.

- Tsai. 2012. Impact of Land Degradation on Soil Microbial Biomass and Activity in Northeast Brazil. *Pedosphere* 22(1): 88–95.
- Öhlinger, R. 1996. Dehydrogenase activity with the substrate TTC. *Methods soil Biol.*: 241–243.
- Ortiz, D.G. 2015. Estabilidad funcional y estructural de las comunidades microbianas de suelos de una cronosecuencia agrícola. Tesis para optar al título de Licenciado en Ciencias Ambientales. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Ortiz, D.G., M. Tosi, M.S. Montecchia, y O.S. Correa. 2015. Comparación de la capacidad metabólica potencial de la microbiota de suelos agrícolas y prístinos de la provincia de Jujuy. En: Cuarto Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos. Esquel, Chubut, Argentina.
- Orwin, K.H., D.A. Wardle, y L.G. Greenfield. 2006. Context-dependent changes in the resistance and resilience of soil microbes to an experimental disturbance for three primary plant chronosequences. *Oikos* 112: 196–208.
- Pajot, H., L. de Figueroa, y J. Fariña. 2007. Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme Microb. Technol.* 40(6): 1503–1511.
- Palojarvi, A. 2006. Phospholipid fatty acid (PLFA) analyses. p. 204–212. En: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (eds.), *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI.
- Paoli, H., J. Volante, Y. Noe, y L. Vale (Eds). 2009. Adecuación a un sistema de información geográfica del estudio “Los Suelos del NOA (Salta y Jujuy), Nadir A. - Chafatinos T., 1990.” Ediciones INTA.
- Paruelo, J., J. Guerschman, y S. Verón. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Cienc. hoy* 15(87): 14–23.
- Paul, E. 2015. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*.
- Paula, F.S., J.L.M. Rodrigues, J. Zhou, L. Wu, R.C. Mueller, B.S. Mirza, B.J.M. Bohannan, K. Nüsslein, Y. Deng, J.M. Tiedje, y V.H. Pellizari. 2014. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. *Mol. Ecol.* 23(12): 2988–99.
- Paz-Ferreiro, J., C. Trasar-Cepeda, M.C. Leirós, S. Seoane, y F. Gil-Sotres. 2010. Effect of management and climate on biochemical properties of grassland soils from Galicia (NW Spain). *Eur. J. Soil Biol.* 46(2): 136–143.
- Pérez-Brandán, C., J. Huidobro, B. Grümberg, M.M. Scandiani, A.G. Luque, J.M. Meriles, y S. Vargas-Gil. 2014. Soybean fungal soil-borne diseases: a parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. *Can. J. Microbiol.* 60(2): 73–84.
- Perez-Brandán, C., J.L. Arzeno, J. Huidobro, B. Grümberg, C. Conforto, S. Hilton, G.D. Bending, J.M. Meriles, y S. Vargas-Gil. 2012. Long-term effect of tillage systems on soil microbiological, chemical and physical parameters and the incidence of charcoal rot by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in soybean. *Crop Prot.* 40: 73–82.
- Pesaro, M., G. Nicollier, J. Zeyer, y F. Widmer. 2004. Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 2577–2587.
- Petric, I., L. Philippot, C. Abbate, A. Bispo, T. Chesnot, S. Hallin, K. Laval, T. Lebeau, P. Lemanceau, C. Leyval, K. Lindström, P. Pandard, E. Romero, A. Sarr, M. Schlöter, P. Simonet, K. Smalla, B.M. Wilke, y F. Martin-Laurent. 2011. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 “Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples.” *J. Microbiol. Methods* 84(3): 454–460.
- Philippot, L., A. Spor, C. Hénault, D. Bru, F. Bizouard, C.M. Jones, A. Sarr, y P.-A. Maron. 2013. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *ISME J.* 7(8): 1609–19.
- Piccolo, M.C., C. Neill, y C.C. Cerri. 1994. Net nitrogen mineralization and net nitrification along a tropical forest-to-pasture chronosequence. *Plant Soil* 162(1): 61–70.
- Pietramellara, G., J. Ascher, M.T. Ceccherini, y G. Renella. 2002. Soil as a biological system. *Ann. Microbiol.* 52(2): 119–131.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, y R Core Team. 2015. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*.
- Postma-Blaauw, M., R. De Goede, y J. Bloem. 2010. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. *Ecology* 91(2): 460–473.
- Priemé, A., S. Christensen, K.E. Dobbie, y K.A. Smith. 1997. Slow increase in rate of methane

- oxidation in soils with time following land use change from arable agriculture to woodland. *Soil Biol. Biochem.* 29(8): 1269–1273.
- Pyle, L. 2012. Isolating the effect of mineral-organic interactions on the decomposition of recalcitrant organic soil carbon.
- R Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.r-project.org/>.
- Rachid, C.T., M.C. Piccolo, D.C. a Leite, F.C. Balieiro, H.L.C. Coutinho, J. van Elsas, R.S. Peixoto, y A.S. Rosado. 2012. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems. *BMC Microbiol.* 12(1): 1.
- Ramsey, P., M. Rillig, K. Feris, y W. Holben. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50: 275–280.
- Reim, A., C. Lüke, S. Krause, J. Pratscher, y P. Frenzel. 2012. One millimetre makes the difference: high-resolution analysis of methane-oxidizing bacteria and their specific activity at the oxic-anoxic interface in a flooded paddy soil. *ISME J.* 6(11): 2128–39.
- Renz, T.E., H. Neufeldt, M.A. Ayarza, J.E. da Silva, y W. Zech. 1999. Acid monophosphatase: an indicator of phosphorus mineralization or of microbial activity? A case study from the Brazilian Cerrados. p. 173–186. In Thomas, R., Ayarza, M.A. (eds.), *Sustainable management for the Oxisols of the Latin American Savannas: Dynamics of soil organic matter and indicators of soil quality*. CIAT publication, Cali, Colombia.
- Ripley, S.W., M. Krzic, G.E. Bradfield, y A.A. Bomke. 2010. Land-use impacts on selected soil properties of the Yungas/Chaco transition forest of Jujuy province, northwestern Argentina: a preliminary study. *Can. J. Soil Sci.* 90: 679–683.
- Robertson, G.P., y P.M. Groffman. 2015. Nitrogen transformations. p. 421–448. En: Paul, E. (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier.
- Rodrigues, J.L.M., V.H. Pellizari, R. Mueller, K. Baek, E.D.C. Jesus, F.S. Paula, B. Mirza, G.S. Hamaoui, S.M. Tsai, B. Feigl, J.M. Tiedje, B.J.M. Bohannan, y K. Nüsslein. 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(3): 988–93.
- Ross, D.J., K.R. Tate, N.A. Scott, y C.W. Feltham. 1999. Land-use change: effects on soil carbon, nitrogen and phosphorus pools and fluxes in three adjacent ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 31(6): 803–813.
- Rossel, D., J. Tarradellas, G. Bitton, y J.-L. Morel. 1997. Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. p. 179–206. En Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (eds.), *Soil Ecotoxicology*. CRC Press.
- Rovati, J.I., O.D. Delgado, L.I.C. Figueroa, y J.I. Fariña. 2010. A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(1): 55–62.
- Ruess, L., y P.M. Chamberlain. 2010. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biol. Biochem.* 42(11): 1898–1910.
- Sá, J.C. de M., C.C. Cerri, W.A. Dick, R. Lal, S.P. Venske Filho, M.C. Piccolo, y B.E. Feigl. 2001. Organic matter dynamics and carbon sequestration rates for a tillage chronosequence in a Brazilian Oxisol. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65(5): 1486–1499.
- Saggar, S., A. Parshotam, C. Hedley, y G. Salt. 1999. <sup>14</sup>C-labelled glucose turnover in New Zealand soils. *Soil Biol. Biochem.* 31(14): 2025–2037.
- Salam, A.K., A. Katayama, y M. Kimura. 1998. Activities of some soil enzymes in different land use systems after deforestation in hilly areas of West Lampung, South Sumatra, Indonesia. *Soil Sci. Plant Nutr.* 44(1): 93–103.
- Schimel, J., T. Balsler, y M. Wallenstein. 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* 88(6): 1386–1394.
- Schimel, J.P., W.J. Scott, y K. Killham. 1989. Changes in cytoplasmic carbon and nitrogen pools in a soil bacterium and a fungus in response to salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6): 1635–1637.
- Seghers, D., E.M. Top, D. Reheul, R. Bulcke, P. Boeckx, W. Verstraete, y S.D. Siciliano. 2003. Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic

- community in agricultural soils. *Environ. Microbiol.* 5(10): 867–877.
- Sharma, P., S.C. Rai, R. Sharma, y E. Sharma. 2004. Effects of land-use change on soil microbial C, N and P in a Himalayan watershed. *Pedobiologia (Jena)*. 48(1): 83–92.
- Shaw, L., y R. Burns. 2006. Enzyme Activity Profiles and Soil Quality. p. 158. En: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (eds.), *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI.
- Shi, X.M., X.G. Li, R.J. Long, P. Bhupinder, T. Zhuo, y M. Feng. 2010. Dynamics of soil organic carbon and nitrogen associated with physically separated fractions in a grassland-cultivation sequence in the Qinghai-Tibetan plateau. *Biol. Fertil. Soils* 43: 103–111.
- Šibanc, N., A. Dumbrecll, I. Mandić-Mulec, y I. Maček. 2014. Impacts of naturally elevated soil CO<sub>2</sub> concentrations on communities of soil archaea and bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 68: 348–356.
- Singh, B.K., K.R. Tate, D.J. Ross, J. Singh, J. Dando, N. Thomas, P. Millard, y J.C. Murrell. 2009. Soil methane oxidation and methanotroph responses to afforestation of pastures with *Pinus radiata* stands. *Soil Biol. Biochem.* 41(10): 2196–2205.
- Singh, B.K., K.R. Tate, G. Kolipaka, C.B. Hedley, C.A. Macdonald, P. Millard, y J.C. Murrell. 2007. Effect of afforestation and reforestation of pastures on the activity and population dynamics of methanotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(16): 5153–5161.
- Six, J., R.T. Conant, E.A. Paul, y K. Paustian. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturatin of soils. *Plant Soil* 241: 155–176.
- Smith, A., E. Marín-Spiotta, M. de Graaff, y T. Balsler. 2014. Microbial community structure varies across soil organic matter aggregate pools during tropical land cover change. *Soil Biol. Biochem.* 77: 292–303.
- Smith, K., T. Ball, F. Conen, K.E. Dobbie, J. Massheder, y A. Rey. 2003. Exchange of greenhousegases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 779–791.
- Sorenson, P., S. Quideau, y M. MacKenzie. 2011. Forest floor development and biochemical properties in reconstructed boreal forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 49: 139–147.
- Sparks, D., A. Page, P. Helmke, R. Loeppert, P. Soltanpour, M. Tabatabai, C. Johnston, y M. Sumner. 1996. *Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods*. 5th ed. Soil Science Society of America, Wisconsin.
- Sparling, G.P., P.B.S. Hart, J.A. August, y D.M. Leslie. 1994. A comparison of soil and microbial carbon, nitrogen, and phosphorus contents, and macro-aggregate stability of a soil under native forest and after clearance for pastures and plantation forest. *Biol. Fertil. Soils* 17(2): 91–100.
- Spohn, M., y M. Chodak. 2015. Microbial respiration per unit biomass increases with carbon-to-nutrient ratios in forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 81: 128–133.
- Stevenson, B., G. Sparling, y L. Schipper. 2004. Pasture and forest soil microbial communities show distinct patterns in their catabolic respiration responses at a landscape scale. *Soil Biol. Biochem.* 36(1): 49–55.
- Sy, V. De, M. Herold, F. Achard, R. Beuchle, J.G.P.W. Clevers, E. Lindquist, y L. Verchot. 2015. Land use patterns and related carbon losses following deforestation in South America. *Environ. Res. Lett.* 10(12): 124004.
- Sydorenko, O., M. Tosi, D. Villarroel Torrez, M.S. Montecchia, O.S. Correa, G. Bordes, J.F.O. Orłowski, M. Barraco, M. Díaz-Zorita, y M.A. Soria. 2013. Efecto del manejo agronómico sobre la microbiota de los suelos del oeste de la provincia de Buenos Aires. p. 179–187. En: Díaz-Zorita, M., Correa, O., Lavado, R. (eds.), *Aportes de la microbiología de suelos a la producción de cultivos*. Editorial Facultad de Agronomía.
- Tate, K.R. 2015. Soil methane oxidation and land-use change - from process to mitigation. *Soil Biol. Biochem.* 80: 260–272.
- Tate, K.R., D.J. Ross, S. Saggar, C.B. Hedley, J. Dando, B.K. Singh, y S.M. Lambie. 2007. Methane uptake in soils from *Pinus radiata* plantations, a reverting shrubland and adjacent pastures: Effects of land-use change, and soil texture, water and mineral nitrogen. *Soil Biol. Biochem.* 39(7): 1437–1449.
- Terrat, S., R. Christen, y S. Dequiedt. 2012. Molecular biomass and metataxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5(1): 135–141.

- Tesouro, M.O., M.A. Roba, A.R. Fernández de Ullivarri, E.N. Otto, J.P. D'Amico, J. Vallejo, y L.B. Donato. 2015. Avances en el desarrollo de una alternativa tecnológica para la implantación de la caña de azúcar. *Cienc. y Tecnol. los Cultiv. Ind. Caña Azúcar. INTA*. 7: 95–105.
- Thalmann, A. 1968. A procedure for the determination of dehydrogenase activity in the soil by means of triphenyltetrazolium chloride (TTC). *Landwirt Forsch*: 249–258.
- Tischer, A., E. Blagodatskaya, y U. Hamer. 2015. Microbial community structure and resource availability drive the catalytic efficiency of soil enzymes under land-use change conditions. *Soil Biol. Biochem.* 89: 226–237.
- Tischer, A., E. Blagodatskaya, y U. Hamer. 2014a. Extracellular enzyme activities in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador affected by low soil P status and land-use change. *Appl. Soil Ecol.* 74: 1–11.
- Tischer, A., K. Potthast, y U. Hamer. 2014b. Land-use and soil depth affect resource and microbial stoichiometry in a tropical mountain rainforest region of southern Ecuador. *Oecologia* 175: 375–393.
- Tosi, M., E. Wassermann, M.S. Montecchia, M.A. Soria, M.A. Carbone Carneiro, y O.S. Correa. 2010. Soil microbial communities from Argentinian Yungas as affected by agricultural activity. *BIOCELL* 34: 114.
- Trahan, N.A., E.L. Dynes, E. Pugh, D.J.P. Moore, y R.K. Monson. 2015. Changes in soil biogeochemistry following disturbance by girdling and mountain pine beetles in subalpine forests. *Oecologia* 177(4): 981–995.
- Trasar-Cepeda, C., M.C. Leirós, y F. Gil-Sotres. 2008a. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 40(9): 2146–2155.
- Trasar-Cepeda, C., M.C. Leirós, S. Seoane, y F. Gil-Sotres. 2008b. Biochemical properties of soils under crop rotation. *Appl. Soil Ecol.* 39(2): 133–143.
- Tsien, H.C., B.J. Bratina, K. Tsuji, y R.S. Hanson. 1990. Use of oligodeoxynucleotide signature probes for identification of physiological groups of methylotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(9): 2858–2865.
- Tunlid, A., y D. White. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. p. 229–262. En: Stotzky, G., Bollag, J. (eds.), *Soil Biochemistry* (Vol. 7). Dekker, Nueva York.
- Upchurch, R., C.Y. Chiu, K. Everett, G. Dyszynski, D.C. Coleman, y W.B. Whitman. 2008. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40(6): 1294–1305.
- van Bruggen, A.H.C., y A.M. Semenov. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Appl. Soil Ecol.* 15(1): 13–24.
- Vance, E.D., P.C. Brookes, y D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19(6): 703–707.
- Verchot, L. V., E.A. Davidson, J.H. Cattânio, y I.L. Ackerman. 2000. Land-use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of eastern Amazonia. *Ecosystems* 3(1): 41–56.
- Větrovský, T., y P. Baldrian. 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLoS One* 8(2): 1–10.
- Viglizzo, E.F., F.C. Frank, L. V. Carreño, E.G. Jobbágy, H. Pereyra, J. Clatt, D. Pincén, y M.F. Ricard. 2011. Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Glob. Chang. Biol.* 17(2): 959–973.
- Volante, J.N., y J.M. Paruelo. 2015. Is Forest Transition taking place? Evidence for the Semiarid Chaco in Argentina. *J. Arid Environ.* 123: 21–30.
- Volante, J.N., D. Alcaraz-Segura, M.J. Mosciaro, E.F. Viglizzo, y J.M. Paruelo. 2012. Ecosystem functional changes associated with land clearing in NW Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 154: 12–22.
- Voroney, R.P., y R.J. Heck. 2015. The soil habitat. p. 15–39. En: Paul, E.A. (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. 4th ed. Academic Press, Oxford, UK.
- Waldrop, M.P., T.C. Balser, y M.K. Firestone. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1837–1846.

- Walker, L., D. Wardle, R. Bardgett, y B. Clarkson. 2010. The use of chronosequences in studies of ecological succession and soil development. *J. Ecol.* 98(4): 725–736.
- Welc, M., E. Bünemann, A. Fließbach, y E. Frossard. 2012. Soil bacterial and fungal communities along a soil chronosequence assessed by fatty acid profiling. *Soil Biol. Biochem.* 49: 184–192.
- Wellner, S., N. Lodders, y P. Kämpfer. 2011. Diversity and biogeography of selected phyllosphere bacteria with special emphasis on *Methylobacterium* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 34(8): 621–630.
- Williams, M. 2007. Response of microbial communities to water stress in irrigated and drought-prone tallgrass prairie soils. *Soil Biol. Biochem.* 39(11): 2750–2757.
- Wixon, D.L., y T.C. Balser. 2013. Toward conceptual clarity: PLFA in warmed soils. *Soil Biol. Biochem.* 57: 769–774.
- Wu, H., Z. Guo, y C. Peng. 2003. Land use induced changes of organic carbon storage in soils of China. *Glob. Chang. Biol.* 9(3): 305–315.
- Wu, Y., N. Ding, G. Wang, J. Xu, J. Wu, y P.C. Brookes. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses. *Geoderma* 150(1–2): 171–178.
- Yao, H., D. Bowman, y W. Shi. 2006. Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: Land-use change versus turfgrass management. *Appl. Soil Ecol.* 34(2–3): 209–218.
- Yao, H., Z. He, M. Wilson, y C. Campbell. 2000. Microbial Biomass and Community Structure in a Sequence of Soils with Increasing Fertility and Changing Land Use. *Microb. Ecol.* 40: 223–237.
- Yu, Z., G. Wang, y P. Marschner. 2014. Drying and rewetting - Effect of frequency of cycles and length of moist period on soil respiration and microbial biomass. *Eur. J. Soil Biol.* 62: 132–137.
- Zak, J.C., M.R. Willig, D.L. Moorhead, and H.G. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26(9): 1101–1108.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol. Fertil. Soils* 29(2): 111–129.
- Zelles, L., Q.Y. Bai, R.X. Ma, R. Rackwitz, K. Winter, y F. Beese. 1994. Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.* 26(4): 439–446.
- Zhao, J., T. Ni, Y. Li, W. Xiong, W. Ran, B. Shen, Q. Shen, y R. Zhang. 2014. Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times. *PLoS One* 9(1): e85301.
- Zheng, Y., X. Liu, L. Zhang, Z. Zhou, and J. He. 2010. Do land utilization patterns affect methanotrophic communities in a Chinese upland red soil? *J. Environ. Sci.* 22(12): 1936–1943.