

## EFFECTOS DEL SISTEMA DE LABRANZA SOBRE LA ACTIVIDAD Y LA ESTRUCTURA MICROBIANA A NIVEL DE LOS MICROAGREGADOS

JUAN PABLO FRENE<sup>1</sup>, LUCIANO ANDRÉS GABBARINI<sup>1</sup>, LUIS GABRIEL WALL<sup>1\*</sup>

Recibido: 26/11/2017

Recibido con revisiones: 10/07/2018

Aceptado: 12/07/2018

### RESUMEN

El conocimiento de la distribución de los microorganismos y la actividad enzimática en las fracciones de agregados del suelo con manejo agrícola puede contribuir a comprender mejor los servicios ecosistémicos del suelo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los sistemas de labranza (siembra directa y labranza convencional) sobre la abundancia de microorganismos (hongos y bacterias) y la actividad biológica del suelo a nivel de los microagregados del suelo. Los estudios se replicaron en suelos de dos sitios ambientalmente diferentes de la región pampeana. Las muestras fueron tamizadas en húmedo, obteniéndose las siguientes fracciones de agregados: 2000-63, 63-20, 20-2 y 2-0,1  $\mu\text{m}$ . La abundancia de bacterias y hongos fue medida por qPCR encontrándose diferente abundancia según el tamaño de agregados. Los perfiles fisiológicos a nivel de comunidades se diferenciaron según el tamaño de agregados independientemente del sistema de labranza y del sitio muestreado. Por el contrario, a nivel de agregados los perfiles de actividad enzimática se agruparon principalmente por el sistema de labranza y no por el tamaño de los mismos. Estos resultados nos permiten sugerir que la provisión de servicios ecosistémicos del suelo es el resultado de una integración de la estructura física a nivel de agregados y la actividad bioquímica propia de éstos.

**Palabras claves:** enzimas, clpp, manejos agrícolas, fracciones de agregado de suelo

## EFFECTS OF TILLAGE SYSTEMS ON MICROBIAL STRUCTURE AND ACTIVITY AT MICROAGGREGATE LEVEL

### ABSTRACT

The knowledge of the distribution of microorganisms and the enzymatic activity at the level of soil fractions aggregates would contribute to a better understanding of the ecosystemic services of the soil. The objective of this work was to determine if two of the most relevant microbial groups, fungi and bacteria, and the biological activity of the soil measured as a respiratory profile induced by substrates and / or the activity of extracellular enzymes, were modified by differential tillage systems, and if that modification was reproduced at the microaggregate level of the soil. Two agricultural farming practices were compared: no-tillage and conventional tillage. The studies were replicated in soils of two different environmentally sites of the Pampean region. The samples were wet sieved, obtaining the following fractions of aggregates: 2000-63, 63-20, 20-2 and 2-0.1  $\mu\text{m}$ . The abundance of bacteria and fungi was estimated by qPCR, finding different abundances according to the size of the aggregates. The physiological profiles at the community level were differentiated according to the aggregates size independently of the tillage management and the sampled site. On the contrary, at the level of aggregates, the enzymatic profiles were differentiated more by soil tillage than by the size of the fraction. These results allow us to suggest that soil ecosystemic services are the result of an integration of the physical structure at the level of aggregates and their own biochemical activities.

**Key words:** enzymes, clpp, agriculture managements, soil aggregates fractions

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Quilmes,

\* Autor de contacto: wall.luisgabriel@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los diferentes manejos que se realizan en los suelos bajo producción agrícola, modifican su estructura biológica y por consiguiente, los servicios ecosistémicos del suelo (Roldán *et al.*, 2005). La labranza convencional (LC) es un sistema de laboreo donde los residuos de los cultivos son incorporados al suelo por la acción del arado o la rastra de discos. Este sistema de labranza se realiza con la intención de introducir la materia orgánica, remover malezas, airear el suelo, reducir la compactación y controlar las plagas que afectan a los cultivos con la finalidad de incrementar la germinación de las semillas y el rendimiento de los cultivos (Raper *et al.*, 2000). Sin embargo, también se sabe que la LC favorece la erosión del suelo por pérdida de materia orgánica debido a un aumento de los procesos de mineralización, disminuye la infiltración del agua y genera pérdida de la estructura física, disminuyendo la calidad del suelo debido a la fragmentación de los agregados del mismo (Allmaras *et al.*, 2000). En contraposición, la siembra directa (SD) es una práctica de manejo utilizada con el fin de preservar la estructura física e incrementar el carbono (C) almacenado en el suelo, de este modo se proporciona un hábitat y sustratos de mayor calidad para la biota mejorando la biofertilidad del suelo (Holland, 2004). En síntesis, diferentes sistemas de labranza influyen diferencialmente sobre las propiedades del suelo, incluyendo la distribución de las fracciones de agregados del suelo y los sustratos disponibles (Six *et al.*, 2006; Tiemann *et al.*, 2015)

El proceso de agregación es un proceso dinámico, en el cual los microagregados se unen entre sí por medio de raíces, hongos, polímeros orgánicos y residuos. A su vez, los microagregados contribuyen a la formación de los macroagregados (Tisdall & Oades, 1982, Lehmann *et al.*, 2017). Cada fracción de agregados constituye un microambiente con características físicas, químicas y estructurales únicas que influyen sobre las comunidades microbianas que allí habitan (Mummey *et al.*, 2006).

Las comunidades microbianas del suelo tienen un rol integral en prácticamente todos los servicios ecosistémicos, incluyendo el ciclado de los

nutrientes y la descomposición de la materia orgánica (Trivedi *et al.*, 2017). La tasa con la cual se llevan a cabo estos procesos está regulada principalmente por aquellos microorganismos que se encuentran presentes en las diferentes fracciones de agregados (Davinic *et al.*, 2012). Sin embargo, poco se sabe sobre como los sistemas de labranza influyen en las comunidades microbianas y su funcionamiento a una escala de microagregados, más propia de los microorganismos (Ettema & Wardle, 2002). Conocer y comprender la distribución de los microorganismos del suelo y su actividad biológica a una escala menor quizás permita comprender mejor los efectos de los diferentes sistemas de labranza y sus efectos sobre los servicios ecosistémicos y la productividad de los suelos a largo plazo (Kandeler *et al.*, 1999; Salinas-García *et al.*, 1997)

El objetivo en este trabajo fue analizar el efecto de sistemas de labranzas contrastantes en la distribución cuali y cuantitativa de las comunidades microbianas y su actividad bioquímica a nivel de diferentes fracciones de tamaños de agregados. Las hipótesis de trabajo son: i) la abundancia de los microorganismos (hongos y bacterias) y las respuestas bioquímicas son condicionadas por el tamaño de la fracción de agregados, ii) el sistema de labranza afecta la distribución de las fracciones de agregados, y iii) que los manejos de labranza no modifican la abundancia de los hongos y bacterias ni las respuestas bioquímicas en las diferentes fracciones de agregados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción de los sitios

Los suelos analizados corresponden a dos establecimientos agrícolas de diferentes zonas de la región pampeana. El primer caso corresponde a un experimento de larga duración que se encuentra en establecimiento Hogar Funke, localizado en Tornquist (Provincia de Buenos Aires, Argentina; 38°09'S 61°57'O). El suelo es un Argiudol Típico (264 mg kg<sup>-1</sup> arcilla, 552 mg kg<sup>-1</sup> limo, 184 mg kg<sup>-1</sup> arena), y es representativo de región pampeana central-sudeste semiárida. La temperatura anual promedio y las precipitaciones son 15 °C y 800mm, respectivamente. Los sistemas de labranza contrastantes, labranza convencional y

siembra directa, fueron establecidos en 1986 en dos parcelas de 8 ha. adyacentes. Los implementos mecánicos utilizados en el sistema de labranza convencional fueron cincel y rastra de disco con una profundidad de 7-20 cm. En ambos manejos agrícolas, la rotación de cultivos y aplicación de agroquímicos fue similar, siendo de este modo la única diferencia entre ambas parcelas el manejo de labranza. Los suelos de Tornquist con SD tuvieron valores de 21,4 mg g<sup>-1</sup> de COT y en la LC de 18,6 mg g<sup>-1</sup>. Los valores de fósforo extraíble en las muestras bajo SD fueron 66,13 mg kg<sup>-1</sup> suelo y en la LC 56,67 mg kg<sup>-1</sup> suelo. El pH en ambos manejos agrícolas fue 6. El segundo sitio de muestreo se ubicó en el establecimiento Las Matreras, localizado en Irineo Portela (Provincia de Buenos Aires; 33°58'S 59°40'O). El ensayo de SD tiene 15 años de historia y se maneja con una rotación de cultivos típica para la zona, trigo/soja-maíz-soja. El campo bajo LC corresponde a un establecimiento vecino a Las Matreras que se venía trabajando con este sistema de labranza al momento del muestreo y sobre el cual no tenemos mayor información de su historia de uso. El caso de estudio en Irineo Portela se incluyó para corroborar si los resultados obtenidos a nivel de microagregados en el ensayo controlado y de larga duración de Tornquist eran observables en otro ambiente edafológico-climático con manejo de labranzas similares. Los casos de suelos analizados en la zona de Irineo Portela corresponden a un Argiudol Típico (261 mg kg<sup>-1</sup> arcilla, 568 mg kg<sup>-1</sup> limo, 171 mg kg<sup>-1</sup> arena), del tipo franco arcilloso limoso. El suelo de la zona constituye una unidad fisiográfica (Pampa ondulada) caracterizada por un relieve predominantemente ondulado y recortado en parte por cañadas, arroyos y ríos, donde sobresalen una serie de elevaciones divisorias de aguas, interfluvios y áreas de nacientes. La temperatura anual promedio y las precipitaciones fueron 17°C y 1070 mm, respectivamente. Los suelos de ambos sistemas de labranza presentaron valores de 42,4 mg g<sup>-1</sup> de COT, 66,8 mg kg<sup>-1</sup> de fósforo extractable y un pH de 5,8.

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

Portela. En cada tratamiento se tomaron cinco muestras separadas por al menos 50 metros. Para cada una de las muestras, se tomaron 25 piques de barreno (2 cm de diámetro) en un área de 5 m<sup>2</sup>, que se mezclaron para generar la muestra compuesta. Posteriormente, las muestras fueron transportadas con geles refrigerantes y una vez en el laboratorio una parte de cada muestra se almacenó a 4°C para su fraccionamiento y determinaciones bioquímicas dentro de los dos primeros meses posteriores al muestreo. Otra parte equivalente fue secada a 40°C, para las determinaciones químicas.

### Fraccionamiento del suelo

Para la separación de las fracciones de microagregados de diferentes tamaños del suelo se realizó el procedimiento descrito por Stemmer *et al.* (1998) y modificado posteriormente por Neumann *et al.* (2013). El suelo se separó en cuatro fracciones de agregados (2000-63, 63-20, 20-2, 2-0,1 μm). Para ello, se tomó una cantidad de suelo conservado a 4°C equivalente a una masa de 20 g de peso seco que se suspendió en agua desionizada (suelo/agua: 1:5 p/v) y se trató con ultrasonido con una energía de 30 J/mL ("Ultrasonic Cleaner", Testlab S.R.L., Argentina). La fracción de 2000-63 μm (arena) fue separada del resto de las fracciones por medio del tamizado de la suspensión de suelo a través de una malla de 63 μm. El líquido filtrado por la malla, que arrastra todas las partículas menores a 63 μm fue centrifugado a 50 g durante 15 min a 4°C (Centrifuga Refrigerada Multi-RF; Thermo Fischer Scientific, EEUU). Para separar la fracción de 2-0,1 μm (arcillas) de la fracción 63-2 μm (limosa), el sobrenadante de la centrifugación conteniendo la fracción 2-0,1 μm fue conservado en un vaso de precipitado y el precipitado fue re-suspendido en agua desionizada y vuelto a centrifugar. La centrifugación y resuspensión del precipitado se repitió ocho veces más, con tiempos de centrifugación decrecientes, 15, 13, 12 y 11 min por duplicado cada uno de ellos, respectivamente. Posterior a la última centrifugación, el precipitado fue tamizado en húmedo con un tamiz con malla de 20 μm, separando así la fracción de agregados 20-2 μm (limosa fina) que atraviesa el tamiz, de la fracción

63-20  $\mu\text{m}$  (limosa gruesa) que queda retenida. Para aumentar la floculación de las partículas menores a 2  $\mu\text{m}$ , se agregó Cloruro de Magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), con una concentración final de 3,3 mM, al contenido de los vasos de precipitados donde se recogieron todos los sobrenadantes de los procesos de resuspensión-centrifugación y se incubaron a 4°C durante 16 h. Posteriormente, las partículas < 2  $\mu\text{m}$  fueron concentradas por centrifugación durante 10 min a 2400 g. Todas las fracciones se secaron a 40°C y luego se determinaron las fracciones de los agregados por pesada. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4° C en heladera hasta su uso.

### Extracción de ADN

EL ADN microbiano del suelo sin fraccionar y de las fracciones de agregados fue extraído y purificado a partir de 0,25 g de las muestras utilizando el kit de extracción ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (Zymo Research Corporation, EEUU) de acuerdo al protocolo del fabricante. La cantidad y la calidad de ADN extraído se determinó por medio de un espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, EEUU), determinando las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 230/260 nm.

### Cuantificación de los grupos microbianos principales por qPCR

La abundancia de las copias de la subunidad pequeña de gen ribosomal del ARN de bacterias y hongos fueron cuantificados usando el protocolo y los oligonucleótidos descrito por Fierer *et al.*, (2005). Para hongos, el oligonucleótido usado fue 5.8s (5'-CGTTGCGTTCTTCATCG-3') combinado con el oligonucleótido ITS1f (5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3'), mientras que para bacterias se usaron los oligonucleótidos Eub338 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y Eub518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Para estimar la abundancia se generaron curvas patrón usando diluciones seriadas a partir de una concentración conocida de ADN extraído de *Pseudomonas protegens* CHAØ o de *Fusarium oxysporum* para bacterias y hongos, respectivamente. El volumen final

de la reacción de real time-PCR fue 25  $\mu\text{l}$ -12,5  $\mu\text{l}$  de Master MixqPCR SYBR (PB-L, Argentina), 3  $\mu\text{l}$  dedeoxi-nucleótidos, 0,75  $\mu\text{l}$  de cada oligonucleótido iniciador (10  $\mu\text{M}$ ), y 7  $\mu\text{l}$  de agua estéril libre de ADN-. En cada reacción se agregó 1  $\mu\text{l}$  de las muestras de ADN de suelo o el ADN utilizado como curva de calibración. La reacción fue llevada a cabo en un ciclador Smart Cycler (Cepheid, EEUU) usando el programa: 94°C durante 15 min seguido por 40 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 50° C y 30 s a 72°C; se utilizó la misma temperatura de hibridación para hongos y bacterias. Se llevaron a cabo curvas de hibridación y geles electroforéticos para confirmar que los productos amplificados fuesen del tamaño adecuado. El número de copias de cada gen bacteriano o fúngico fue generado usando una ecuación de regresión para cada ensayo relacionando el valor del ciclo umbral (Ct) para conocer el número de copias en los patrones con una concentración conocida de ADN por medio del programa Lin-RegPCR (Ruijter *et al.*, 2015). Todas las reacciones de qPCR fueron corridas por triplicados para cada ADN extraído de las muestras de suelo con el fin de obtener un valor promedio.

### Análisis de la actividad de enzimas extracelulares (EAA)

El análisis de la actividad potencial de enzimas hidrolíticas se realizó mediante ensayos en placas de 96 celdas o pocillos, por fluorescencia (Marx *et al.*, 2001) en suelo sin fraccionar y en distintas fracciones de microagregados. Las muestras de suelo fueron ensayadas como fuente de enzimas para las siguientes actividades enzimáticas:  $\beta$ -cellobiohidrolasa (CEL), N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (NAG),  $\beta$ -glucosidasa (BG), fosfatasa (PME), y arilsulfatasa (SUL).

La suspensión de suelo sin fraccionar y de las fracciones de agregados analizadas se realizó agregando 0,1 g de suelo a un tubo de 20 ml (BMT-20 S, IKA, Alemania) junto con 10 esferas de acero de 5 mm de diámetro en 10 ml de buffer MES (ácido etanolsulfónico 2-[N-Morfolino]; Sigma, E.E.U.U.) estéril 0,1M y pH 6,1. La suspensión se homogenizó con la ayuda del ULTRA TURRAX® Tube Drive (IKA, Alemania) que agitó las esferas de acero durante dos minutos a 6000

rpm y temperatura ambiente. La suspensión de suelo generada fue inmediatamente utilizada para medir las cinéticas enzimáticas.

Para realizar el ensayo se descargaron 200 ml de suspensión de suelo por pocillo con micropipeta automática de 8 canales en una placa de 96 pocillos. La turbidez propia del suelo y los compuestos fenólicos que contiene disminuyen en cierto grado la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo 4-metilumbelliferona (4-MUB; Marx *et al.*, 2001). El grado en que se apaga esta señal varía para los diferentes suelos por lo tanto se realizó una corrección para cada suelo (muestra + 4-MUB). Además, en cada placa se incluyó la mezcla de reacción de la muestra por triplicado para cada una de las concentraciones de sustrato (muestra + sustrato), un control de sustrato (sustrato + buffer) y un control de muestra (muestra + buffer). El volumen final de la mezcla de reacción en cada pocillo fue de 250  $\mu$ l. La fluorescencia de los controles se restó al valor de las muestras. Como estándar se utilizó 4-MUB en concentración final de 2  $\mu$ M en el pocillo. Los sustratos 4-MUB-Fosfato, 4-MUB- $\beta$ -D-cellobiosa, 4-MUB-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina, 4-MUB- $\beta$ -D-glucopiranososa, y 4-MUB-sulfato (Sigma, E.E.U.U.) se disolvieron en agua estéril y las concentraciones finales en los pocillos fueron de 40  $\mu$ M.

La intensidad de la fluorescencia se leyó a 355 nm y a 460 nm de longitud de onda de excitación y de emisión, respectivamente, en el lector de fluorescencia para placas (POLARstar Omega, BMG LABTECH, Alemania). El lector fue programado para realizar 25 ciclos de lectura de 60 seg a 30 °C. Las actividades enzimáticas se calcularon como la cantidad de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo y se expresó en nmol de 4-MUB producidos por hora y por gramo de suelo seco.

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

Para este ensayo se utilizaron unas placas de 96 pocillos previamente preparadas con un sistema biosensor de oxígeno para los análisis fisiológicos de suelo (Garland *et al.*, 2003) que

diseñamos y construimos de acuerdo al trabajo de McLamore *et al.* (2014). Las suspensiones de suelo fueron preparadas mezclando 1 g de suelo con 5 ml de agua destilada estéril en un tubo de 15 ml conteniendo aproximadamente 5 ml de perlititas de metal de 2 mm para mezclado y homogenizado mediante ULTRA TURRAX Tube Drive (IKA, Alemania) durante 20 min. Las fuentes de C seleccionadas fueron el ácido p-cumárico, ácido propiónico y ácido vanílico (Sigma-Aldrich Co. Ltd.). Las fuentes de carbono utilizadas como sustrato se eligieron de acuerdo a trabajos previos (Zabaloy, 2008, Frene *et al.*, 2014) siendo estos los sustratos que mayor diversidad de respuestas mostraron entre tratamientos, probablemente por constituir fuentes de carbono cuya degradación implica rutas metabólicas particulares, resaltando las diferenciaciones de respuesta a nivel de comunidades microbianas complejas. Las soluciones madre de fuente de C (300 mg L<sup>-1</sup>) fueron preparadas para obtener una concentración final en el pocillo de 50 mg L<sup>-1</sup> de C. Todas las soluciones stocks y el agua destilada fueron esterilizadas utilizando filtros (<0,22  $\mu$ m, Sartor, EEUU) y almacenados a 4° C previos a ser ensayadas en las microplacas.

En cada pocillo se agregaron 40  $\mu$ l de las soluciones de las fuentes de C o agua desionizada estéril para determinar la respiración inducida por sustrato o la respiración basal, respectivamente. En cada pocillo, se agregaron 160  $\mu$ l de las suspensiones de suelo con la adición 40  $\mu$ l de agua desionizada estéril hasta un volumen final de 240  $\mu$ l.

Los datos de las cinéticas de fluorescencia de los consumos de oxígeno fueron expresados como unidades de fluorescencia relativa normalizadas (UFRN). Los valores de UFRN se obtuvieron dividiendo el valor de fluorescencia en cada punto por el valor de fluorescencia medido una hora después de haber comenzado el ensayo. El tiempo mínimo de respuesta (TMR) fue definido como el tiempo necesario para alcanzar un valor de 1,1 de UFRN. El pico de la respuesta fluorescente (Fmax) fue calculado para todas las muestras como otro parámetro de la actividad respiratoria, asumiendo una tasa de difusión constante.

## Análisis Estadístico

Las medias de los parámetros calculados para los tratamientos y las fracciones de agregados del suelo fueron analizadas por medio del test Análisis de la Varianza ANOVA, previa corroboración de los supuestos de normalidad y heterocedasticidad. Las comparaciones de medias se realizaron con el LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ). Los datos experimentales fueron analizados y visualizados utilizando un análisis multivariado de coordenadas principales (ACoP), ya que este posibilita cuantificar la distancias euclideas entre las muestras. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013).

## RESULTADOS

### Distribución de las fracciones de agregados

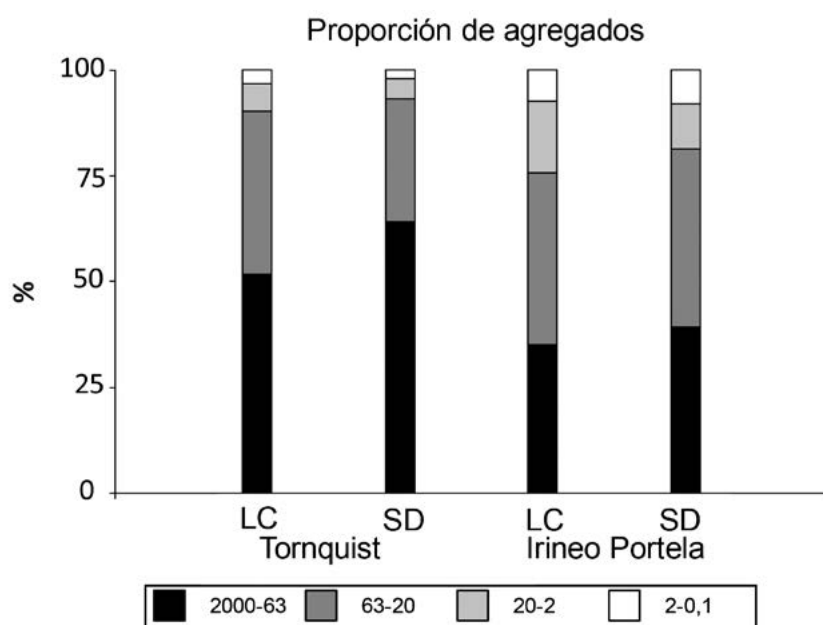
Los suelos de Tornquist presentaron la mayor proporción de agregados en la fracción 2000-63  $\mu\text{m}$  (**Figura 1**), siendo significativamente mayor en las muestras de SD que en las muestras de LC ( $P = 0,019$ ), seguido por la fracción 63-20  $\mu\text{m}$ ,

donde las muestras de la LC presentaron valores significativamente mayores que las muestras de SD ( $P = 0,028$ ). Las fracciones 20-2  $\mu\text{m}$  y 2-0,1  $\mu\text{m}$  no presentaron diferencias significativas entre los sistemas de labranza.

En los suelos de Irineo Pórtela (**Figura 1**), en las fracciones 2000-63  $\mu\text{m}$  y 63-20  $\mu\text{m}$  no se presentaron diferencias significativas entre los sistemas de labranza, siendo la fracción 63-20  $\mu\text{m}$  la que presentó la mayor proporción en ambos casos. En la fracción 20-2  $\mu\text{m}$ , las muestras de la LC mostraron valores mayores que la SD ( $P = 0,025$ ). Por último, la fracción 2-0,1  $\mu\text{m}$  no presentó diferencias significativas entre tratamientos.

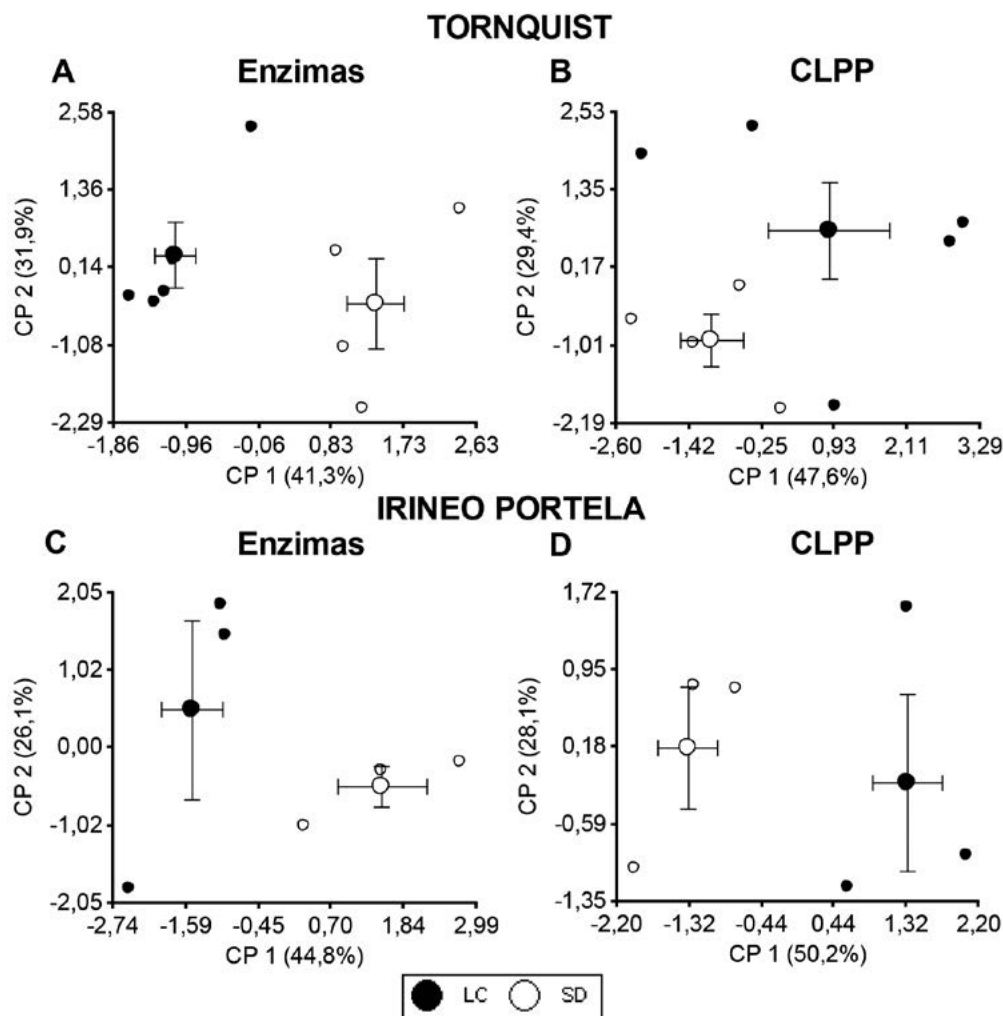
### Análisis de las actividades biológicas de los suelos sin fraccionar

En una primera etapa se analizaron los perfiles de enzimas y CLPP de los suelos sin fraccionar (SSF) buscando diferencias de acuerdo al sistema de labranza (**Figura 2**). En el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de los perfiles enzimá-



**Figura 1.** Proporción de cada fracción de tamaño de agregados, 200-63 mm, 63-20 mm, 20-2 mm, 2-0,1 mm, sobre el total de suelo recuperado en el fraccionamiento de suelo de Tornquist y de Irineo Portela.

**Figure 1.** Amount of each aggregates size fraction, 200-63 mm, 63-20 mm, 20-2 mm, 2-0,1 mm, and total sum of aggregate fractions from soil samples of Tornquist and Irineo Portela.



LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

LC = conventional tillage; SD = No-tillage.

**Figura 2.** Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) de las muestras de suelo sin fraccionar basados en a) perfil enzimático para Tornquist, b) CLPP para Tornquist, c) perfil enzimático para Pórtela y d) CLPP para Irineo Portela ( $n=3$ ).

**Figure 2.** Principal Coordinate Analysis (PCoA) from bulk soil samples based on for a) enzymatic profile for Tornquist, b) CLPP for Tornquist, c) enzymatic profile for Irineo Portela, and d) CLPP for Irineo Portela ( $n = 3$ ).

ticos para los suelos de Tornquist las muestras se separaron por sistema de labranza (**Figura 2A**). De forma similar, el ACoP basado en los datos del CLPP también diferenció los suelos de Tornquist de acuerdo al sistema de labranza (**Figura 2B**).

En el ACoP basado en el perfil enzimático de las muestras de Irineo Pórtela (**Figura 2C**) las muestras también se agruparon por sistema de labranza y lo mismo ocurre cuando se analizó el ACoP basado en los datos de CLPP de esos suelos (**Figura 2D**).

### Abundancia de hongos y bacterias a nivel de microagregados

En las muestras de Tornquist, no hubo diferencias significativas entre fracciones ni entre tratamientos para las abundancias de los microorganismos medidos (**Tabla 1**).

En las muestras de Irineo Pórtela, SD presentó mayor abundancia bacteriana en las fracciones 2000-63, 63-20 y 2-0,1  $\mu\text{m}$  ( $P = 0.015$ ,  $P = 0.0149$ ,  $P = 0.0001$  respectivamente) respecto

**Tabla 1.** Abundancia de bacterias y hongos (n = 5). Los valores con idéntica letra no se diferencian significativamente ( $P < 0,05$ ). Las letras mayúsculas representan las diferencias entre fracciones de tamaños agregados dentro de cada tratamiento y letras minúsculas entre tratamientos para cada sitio y fracción de agregados.

**Table 1.** Bacteria and fungi abundance (n = 5). The values with identical letters do not differ significantly ( $P < 0.05$ ). Capital letter represents differences within soil aggregate size fractions and the lowercase between treatments for site and soil aggregate fractions. SD = Siembra directa; LC = Labranza convencional; SSF = % de recuperación del fraccionamiento respecto del suelo sin fraccionar.

SD = No-tillage; LC = Conventional tillage; SSF = % of bulk soil recovery after fractionation.

Sitio	Manejo Agrícola	Fracción de agregados	Abundancia Bacteriana (n° copia/ g fracción)	Abundancia Fúngica (n° copia/ g fracción)	
Tornquist	SD	SSF	4,46E+08 a	1,27E+07 a	
		2000-63	1,02E+09 Aa	1,74E+08 Aa	
		63-20	6,92E+08 Aa	1,66E+08 Aa	
		20-2	2,56E+09 Aa	3,06E+08 Aa	
		2-0,1	2,61E+08 Aa	2,84E+07 Aa	
		LC	SSF	3,62E+08 a	3,10E+07 a
		2000-63	1,89E+08 Ba	5,46E+07 Aa	
		63-20	9,85E+08 ABa	8,30E+07 Aa	
		20-2	2,59E+09 Aa	7,21E+07 Aa	
		2-0,1	2,88E+08 Ba	5,50E+06 Aa	
	Irineo Portela	SD	SSF	3,45E+09a	2,85E+08 a
			2000-63	2,88E+09 Aa	3,08E+08 Aa
63-20			2,88E+09 Aa	2,48E+08 Aa	
20-2			3,07E+09 Aa	2,23E+08 Aa	
2-0,1			3,32E+9 Aa	2,73E+08 Aa	
LC			SSF	5,95E+08b	3,16E+08 a
		2000-63	6,37E+08 Bb	3,26E+08 Aa	
		63-20	6,32E+08 Bb	3,37E+08 Aa	
		20-2	1,77E+09 Aa	3,14E+08 Aa	
		2-0,1	5,39E+08 Ba	2,56E+08 Aa	

LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

LC = conventional tillage; SD = No-tillage

a LC. Bajo LC los mayores valores de abundancia bacteriana se encontraron en la fracción 20-2  $\mu\text{m}$  (**Tabla 1**).

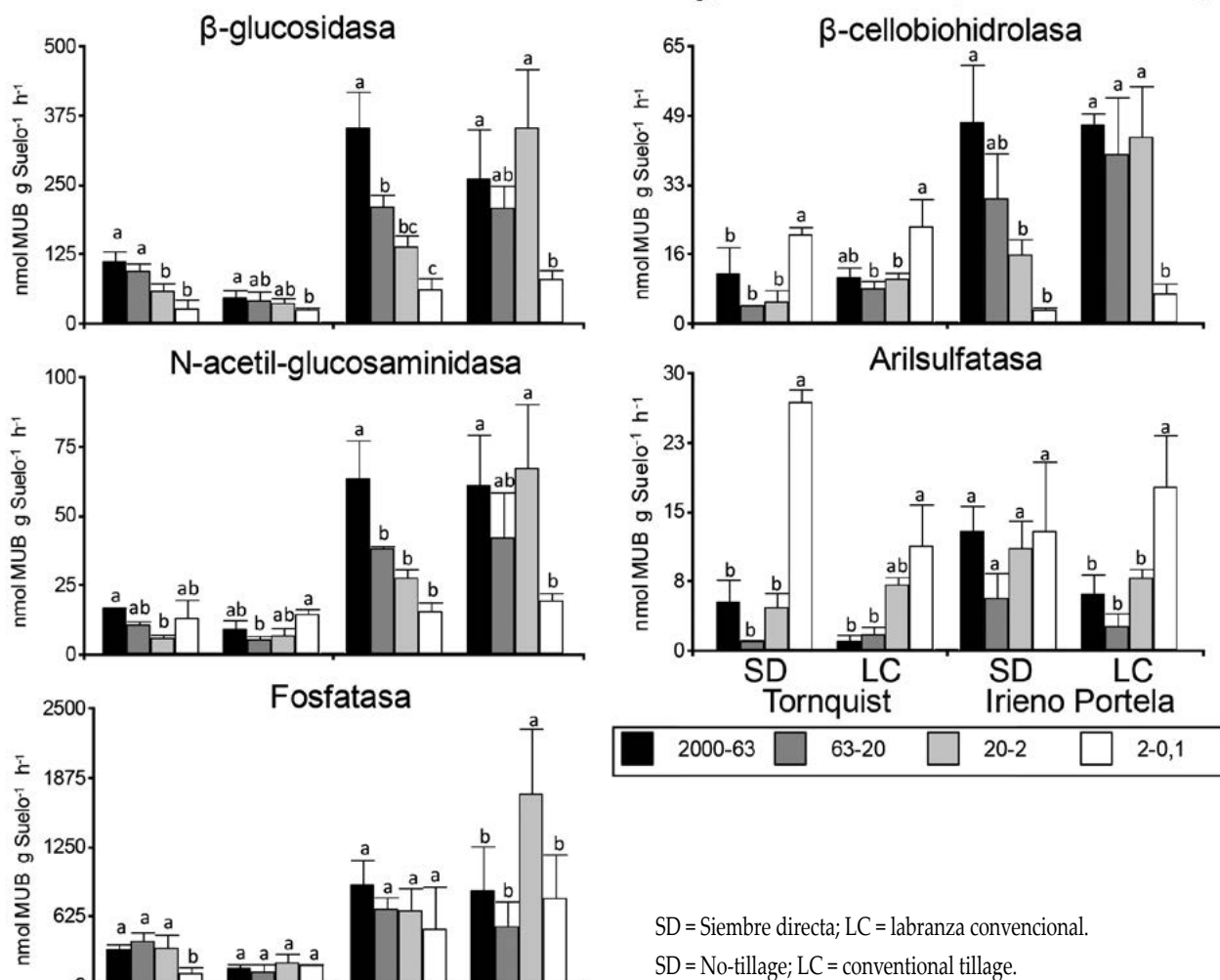
La abundancia de los hongos no presentó diferencias significativas entre tratamientos ni fracciones en ninguno de los dos sitios.

### Actividades enzimáticas a nivel de microagregados.

En las muestras de Tornquist en SD, las actividades de la enzimas  $\beta$ -glucosidasa (BG) fueron mayores tanto en la fracción de 2000-63

mm como la de 63-20 mm respecto a las de 20-2 mm y 2-0.1 mm. La actividad de N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (NAG) fueron mayores en la fracción 2000-63  $\mu\text{m}$  respecto a las actividades en las fracciones 20-2 (**Figura 3**). Estas enzimas presentaron una disminución de su actividad específica desde la fracción 2000-63  $\mu\text{m}$  hasta la fracción 20-2  $\mu\text{m}$ . La actividad de fosfatasa (PME) no mostró diferencias significativas relevantes entre fracciones, salvo para la fracción 2-0.1 mm que tuvo valores significativamente menores respecto a las otras fracciones. La actividad de la  $\beta$ -cellobiohidrolasa (CEL) y la arilsulfatasa (SUL) presentaron las mayores actividades en la frac-





**Figura 3.** Actividad enzimática para cada fracción de tamaño de agregados del suelo y sitio. Las barras de error representan el error estándar y las letras marcan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las fracciones de agregados para cada tratamiento y sitio ( $n = 5$ ).

**Figure 3.** Enzymatic activity for each soil aggregate fractions and site. Error bars represented standard error and letters point differences between soil aggregates fractions for each treatment and site ( $n = 5$ ).

ción 2-0,1  $\mu$ m. Por otro lado, en las muestras de Tornquist en LC, la actividad de la enzima BG fue mayor en la fracción 2000-63  $\mu$ m en relación a la fracción 2-0,1  $\mu$ m y disminuyendo su valor con el tamaño de la fracción. Las actividades de NAG y PME no mostraron diferencias relevantes entre fracciones en general salvo para el caso de NAG cuya actividad en la fracción 63-20  $\mu$ m fue significativamente menor que la de 2-0,1  $\mu$ m; la actividad de CEL y SUL resultó superior en la fracción 2-0,1  $\mu$ m. Cuando se compara entre sistemas de labranza para el sitio de Tornquist solo se encontraron diferencias significativas, con valores mayores en SD que en LC, para la actividad BG en la fracción 2000-63  $\mu$ m ( $P = 0,047$ )

y la actividad SUL en la fracción 2-0,1  $\mu$ m ( $P = 0,028$ ).

En las muestras de Irieno Portela (**Figura 3**) se verifica una mayor actividad enzimática general respecto de las actividades de los suelos de Tornquist ( $P < 0,0001$  para todas las actividades enzimáticas con excepción de SUL donde no hubo diferencias significativas). En comparación al resto de las fracciones en el mismo suelo, las muestras presentaron mayor actividad para las cinco enzimas en la fracción 2000-63  $\mu$ m en SD y las actividades de BG, NAG y CEL disminuyeron con el tamaño de fracción. En las muestras en LC, la actividad de PME fue mayor en la fracción 20-2  $\mu$ m respecto al resto de las fracciones, y la

actividad de la CEL fue alta y similar en las tres fracciones de mayor tamaño. Finalmente, la SUL mostró la mayor actividad en la fracción 2-0,1  $\mu\text{m}$ . No se presentaron diferencias significativas en la actividad enzimática entre los sistemas de labranza en ninguna fracción de agregados.

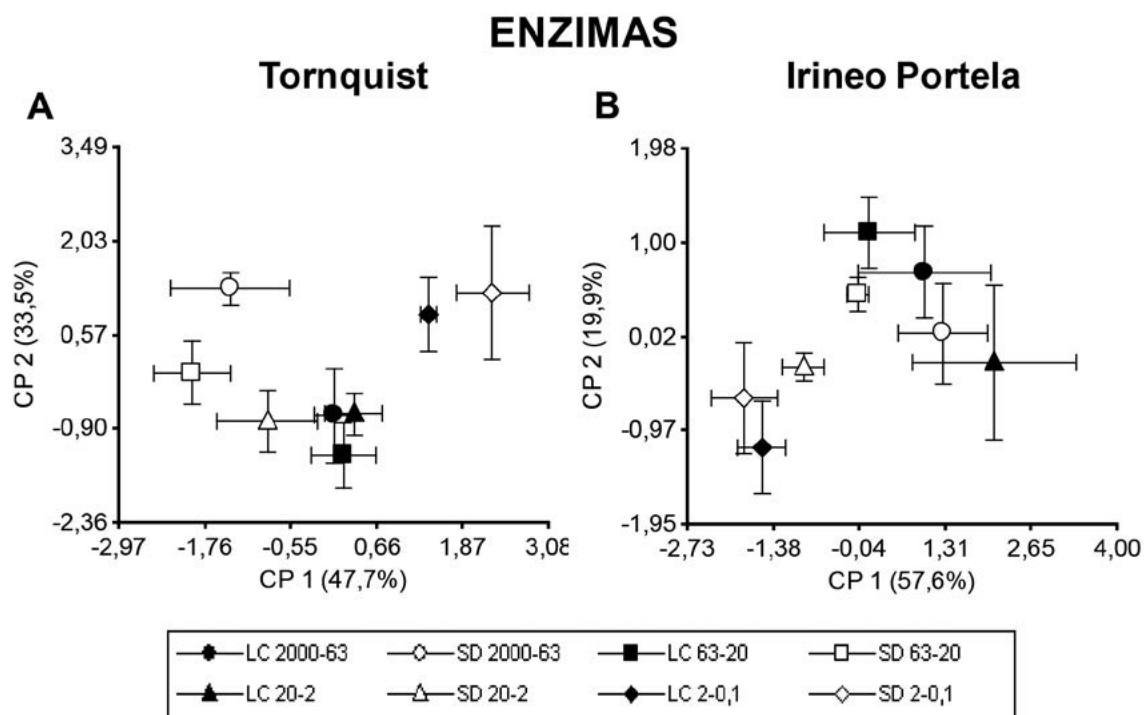
En el análisis multivariado ACoP del perfil enzimático de las fracciones de agregados provenientes de ambos sistemas de labranza para los suelos de Tornquist (**Figura 4A**), encontramos que las muestras de mayor tamaño, 2000-63  $\mu\text{m}$  y 63-20  $\mu\text{m}$  tienden a agruparse por sistema de labranza mientras que las de menor tamaño 20-2 y 2-0,1  $\mu\text{m}$  tienden a agruparse por tamaño de fracción.

En el ACoP del perfil enzimático de las fracciones de agregados provenientes de Irineo Portela (**Figura 4B**) las muestras presentaron menor separación de acuerdo al sistema de labranza que lo observado en las muestras de Tornquist (**Figura**

**4A**). Las fracciones de agregados de 63-20  $\mu\text{m}$  y 2000-63  $\mu\text{m}$  se ubicaron cercanas entre sí, mientras que ambas fracciones de 2-0,1  $\mu\text{m}$  se separaron del resto de las fracciones de agregados en cercanía con la fracción 20-2  $\mu\text{m}$  perteneciente a la SD (**Figura 4B**).

#### Análisis de los perfiles fisiológicos (CLPP) a nivel de microagregados.

El análisis multivariado ACoP, de los perfiles fisiológicos de las diferentes fracciones arrojó un resultado diferente a lo observado para los perfiles enzimáticos (**Figura 5**). En el caso de Tornquist (**Figura 5A**), las muestras tienden a agruparse por tamaño de fracción más que por el sistema de labranza. Las fracciones de agregados 2000-63  $\mu\text{m}$  y 63-20  $\mu\text{m}$  presentaron las menores distancias entre sistema de labranza. Por otro lado, ambas fracciones de 2-0,1  $\mu\text{m}$  se separaron del resto de las fracciones de agregados.

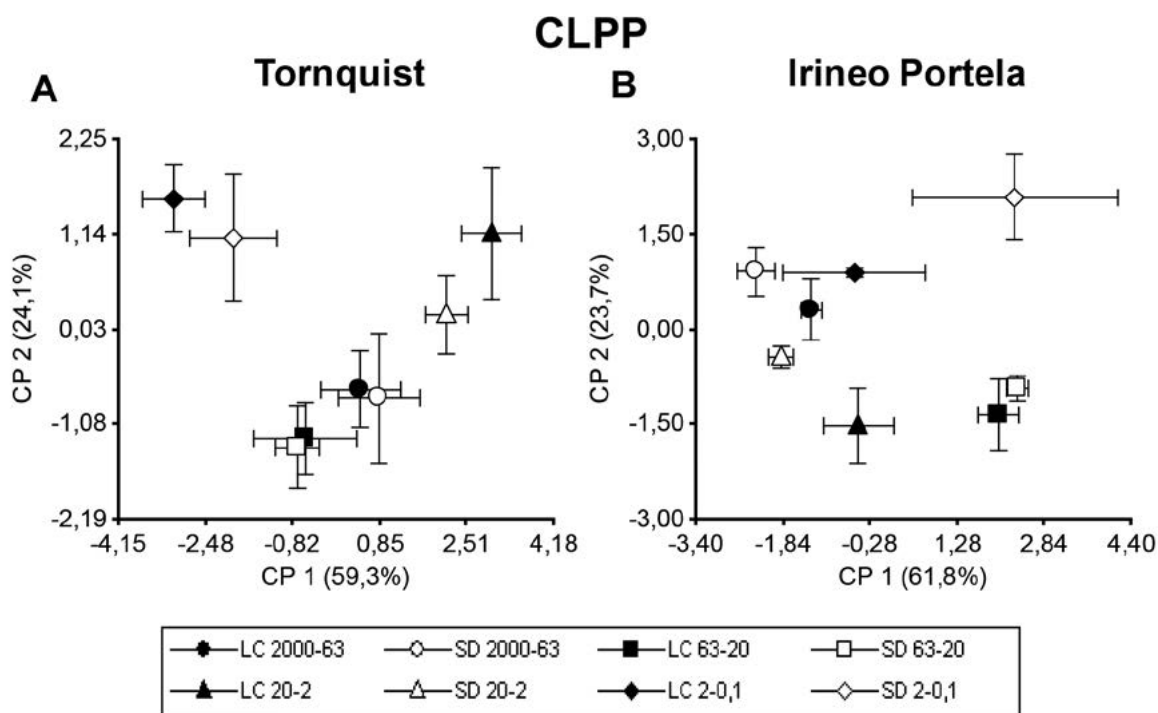


LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

LC = conventional tillage; SD = No-tillage

**Figura 4.** Análisis de Coordenadas Principales del perfil enzimático de las muestras de las fracciones de agregados para A) Tornquist, B) Irineo Pórtela (n=10).

**Figure 4.** Principal Coordinate Analysis of the enzymatic profile from soil aggregates fraction samples for A) Tornquist, B) Irineo Portela (n = 10).



LC = labranza convencional; SD = siembra directa.

LC = conventional tillage; SD = No-tillage.

CLPP = Perfil fisiológico a nivel de comunidades microbianas; CLPP= Microbial community level physiological profile

**Figura 5.** Análisis de Coordenadas Principales para el CLPP de las muestras de las fracciones de agregados para a) Tornquist y b) Irineo Pórtela (n=10).

**Figure 5.** Principal Coordinate Analysis of CLPP from soil aggregates fraction samples for A) Tornquist, B) Irineo Portela (n = 10).

En el ACoP de las muestras de suelo de Irineo Portela (**Figura 5B**), las muestras se agruparon de acuerdo al tamaño de fracción principalmente, y solo se separa del resto la fracción de 2-0,1  $\mu\text{m}$  perteneciente a la LC.

## DISCUSIÓN

Las comunidades microbianas determinan en gran medida la actividad bioquímica de los suelos. El mecanismo primario por el que los sistemas de labranzas influyen sobre las comunidades microbianas del suelo es a través de la transformación de la estructura del suelo y la disponibilidad de sustratos (Elliott & Coleman, 1988). Los datos obtenidos en este trabajo en un primer análisis del suelo sin fraccionar muestran que dos sistemas de labranza contrastantes modifican en forma diferencial el perfil bioquímico del suelo como han sugerido otros autores (Kandeler *et al.*, 1999). Esta observación se verifica tanto a nivel de actividad de enzimas del suelo como de perfi-

les fisiológicos a nivel de comunidades microbianas. A partir de esta diferencia surgió la pregunta sobre lo que sucede a nivel de los microagregados de diferente tamaño, resistentes al tamizado en húmedo de los suelos, para profundizar en el conocimiento de la relación estructura y función de los suelos.

El conocimiento de las comunidades microbianas dentro de cada microambiente (fracciones de agregados) es de interés científico para poder comprender mejor los mecanismos que conducen los procesos de ciclado de los nutrientes en el suelo, los cuales tienen importantes implicaciones en la provisión de servicios ecosistémicos (Grundmann *et al.*, 2004). La determinación de la abundancia relativa de hongos y bacterias por qPCR a partir de las fracciones de agregados de diferentes tamaños mostró algunas diferencias dependiendo del tamaño del agregado y del sitio o tipo de suelo. En Tornquist no se encontraron diferencias en las abundancias. En el suelo de Irineo

Portela los agregados de 2000-63 mm mostraron diferencias en la abundancia de bacterias respecto del sistema de labranza, con mayor abundancia en los agregados provenientes del suelo en SD y este comportamiento se extendió a la fracción 63-20 mm (**Tabla 1**). Un reciente análisis de metadatos sugiere la importancia de las bacterias en la agregación de microagregados mientras que los hongos tendrían una mayor participación en la estabilidad de los macroagregados (Lehmann *et al.*, 2017). Este tipo de resultado ha sido explicado como la consecuencia de una mayor protección física para los microorganismos en este tamaño de fracción (Lagomarsino *et al.*, 2012; Sessitsch *et al.*, 2001) donde se encuentran los mayores niveles de C (Neumann *et al.*, 2013). De todos modos es importante recordar que abundancias equivalentes de los grupos microbiológico pueden contener una estructura diferente en la diversidad microbiológica que resulte en distintas capacidades fisiológicas. Si bien en este trabajo no hemos analizado la diversidad de la estructura microbiológica de bacterias u hongos, las determinaciones de comportamientos diferenciales de los CLPP en los suelos con diferentes labranzas sugieren que las comunidades microbiológicas son diferentes.

A nivel de los agregados, en el caso de Tornquist, el análisis de los CLPP evidenció una agrupación de las muestras por tamaño de agregados, más que por sistema de labranza del suelo, lo que sugiere una comunidad microbiana de características semejantes de acuerdo al tamaño del agregado que sería independiente de ambos sistemas de labranza (SD y LC).

El patrón general de las actividades enzimáticas estaría gobernado por la cantidad y calidad de los sustratos orgánicos (Deng & Tabatabai, 1996). Las diferentes enzimas se encuentran asociadas de manera diferencial con las arcillas o con los residuos de las plantas, dependiendo del mecanismo de estabilización físico-químico y las disponibilidades de los sustratos (Lagomarsino *et al.*, 2012; Allison & Jastrow, 2006; Kandeler *et al.*, 1999). En este trabajo observamos una distribución de las actividades enzimáticas específicas de acuerdo al sistema de labranza a nivel de las diferentes fracciones de microagregados del suelo (**Figura 3**). En los suelos bajo SD las actividades

de las enzimas BG, NAG fueron mayores en las fracciones más grandes de 2000-63 mm y en algunos casos también 63-20 mm y la actividad disminuyó desde las fracciones más grandes a las de menor tamaño, principalmente en los suelos de Irineo Pórtela. Estas diferencias no se observan en las muestras de los suelos bajo LC. Para el caso de SD se ha demostrado que el C orgánico (fresco o lábil) derivado de los residuos de los cultivos es primero incorporado en las fracciones de mayor tamaño (2000-200  $\mu\text{m}$ ) durante la descomposición inicial y luego acumulado en las de menor tamaño (Six *et al.*, 2000; Stemmer *et al.*, 1998) Consecuentemente, esto se traduce en un mayor contenido de C y N lábil en las fracciones de mayor tamaño, lo que estimularía una mayor producción de enzimas extracelulares (Qin *et al.*, 2010), resultados que se verifica en las fracciones de 2000-63  $\mu\text{m}$  y 63-20  $\mu\text{m}$  para las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa (**Figura 3**) de los ciclos de C y N respectivamente. En concordancia con nuestras observaciones para la enzima  $\beta$ -glucosidasa, Allison & Jastrow (2006) observaron que la mayor actividad de las enzimas relacionadas con el C y P, también analizadas en este trabajo, se encuentran favorecidas en las fracciones mayores a 250  $\mu\text{m}$ , sugiriendo que los microorganismos aquí presentes producen mayores cantidades de enzimas hidrolíticas, con el fin de degradar los materiales derivados de las plantas presentes en mayor abundancia en las fracciones de mayor tamaño en la SD (Marx *et al.*, 2005). La falta de concordancia con las actividades de fosfatasa en nuestros resultados, que no mostraron una mayor actividad en los agregados de mayor tamaño, podría variar de acuerdo a la disponibilidad de P en los diferentes suelos que se comparan. En cambio, en las fracciones de menor tamaño, el C se encontraría protegido por las partículas minerales y consecuentemente tendría una baja disponibilidad microbiana y eso conduciría a una menor actividad enzimática en esas fracciones (Qin *et al.*, 2010). Por el contrario, en el caso de LC, la pérdida de la estructura y el aumento de la mineralización del C, especialmente en las fracciones de mayor tamaño que no están protegidas por las arcillas, podría explicar los menores valores enzimáticos encontrados en algunas de las fracciones de mayor tamaño en los

suelos de LC al contrario de lo que ocurre en las mismas fracciones de SD.

En líneas generales nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Jiang y colaboradores (2011), quienes mostraron que el tamaño de agregados determina el patrón de distribución de la actividad microbiana en el suelo, donde el efecto de la labranza no fue significativo a escala de los microagregados.

## CONCLUSIONES

La comparación de suelos bajo diferentes sistemas de labranza, siembra directa y labranza convencional, muestra que el factor mecánico modifica las propiedades bioquímicas del suelo generando diferencias en los perfiles enzimáticos y en los perfiles fisiológicos del mismo. La labranza también modifica las proporciones de microagregados que forman el suelo. Las diferencias bioquímicas por labranza halladas en el suelo sin fraccionar no se observan cuando las mismas son analizadas a nivel de los microagregados. Esto implica que las propiedades bioquímicas de los suelos y las prestaciones ecosistémicas que derivan de ellas, dependen de la proporción de microagregados que generan los diferentes sistemas de labranza.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Cristian Klein y a Belén Agosti por su participación en los muestreos. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Argentina (ANPCYT PAE 36976 y PID53) y la Universidad Nacional de Quilmes (PUNQ R732/11). LA Gabbarini y LG Wall son investigadores de CONICET y JP Frene fue becario Doctoral CONICET durante este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- Allison, SD & JD Jastrow. 2006. Activities of extracellular enzymes in physically isolated fractions of restored grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 38, 3245–3256.
- Allmaras, RR; HH Schomberg; CL Douglas & TH Dao. 2000. Soil organic carbon sequestration potential of adopting conservation tillage in US croplands. *J. Soil Water Conserv.* 55, 365–373.
- Davinic, M; LM Fultz; V Acosta-Martinez; FJ Calderón; SB Cox; SE Dowd; VG Allen; JC Zak & J Moore-Kucera. 2012. Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biol. Biochem.* 46, 63–72.
- Deng, SP & MA Tabatabai. 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. *Biol. Fertil. Soils* 22, 202–207.
- Di Rienzo JA, F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, n.d.
- Elliott, ET & DC Coleman. 1988. Let the soil work for us. *Ecol. Bull.* 23–32.
- Ettema, CH & DA Wardle. 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17, 177–183.
- Fierer, N; JA Jackson; R Vilgalys & RB Jackson. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4117–4120.
- Frene, JP; LA Gabbarini & LG Wall. 2014. Perfil fisiológico del suelo y discriminación de prácticas agrícolas. Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, Bahía Blanca, 5 al 9 de mayo.
- Garland, JL; MS Roberts; LH Levine & AL Mills. 2003. Community-level physiological profiling performed with an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2994–2998.
- Grundmann, GL. 2004. Spatial scales of soil bacterial diversity – the size of a clone. *FEMS Micr. Ecol.* 48, 119–127.
- Holland, JM. 2004. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric. Ecosyst. Environ.* 103, 1–25.
- Jiang, X; AL Wright; J Wang & Z Li. 2011. Long-term tillage effects on the distribution patterns of microbial biomass and activities within soil aggregates. *Catena* 87, 276–280.
- Kandeler, E; M Stemmer & EM Klimanek. 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biol. Biochem.* 31, 261–273. doi:10.1016/S0038-0717(98)00115-1
- Lagomarsino, A; S Grego & E Kandeler. 2012. Soil organic carbon distribution drives microbial activity and functional diversity in particle and aggregate-size fractions. *Pedobiologia* 55, 101–110.
- Lehmann, A; W Zheng & MC Rillig. 2017. Soil biota contributions to soil aggregation. *Nature Ecology & Evolution* 1, 1828–1835
- Marx, MC; M Wood & SC Jarvis. 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1633–1640.

- McLamore, E; J Garland; C Mackowiak; A Desaunay; N Garland; P Chaturvedi; M Taguchi K Dreaden; J Catechis & J Ullman. 2014. Development and validation of an open source O<sub>2</sub>-sensitive gel for physiological profiling of soil microbial communities. *J Microbiol Methods* 96:62–67
- Mummey, D; W Holben; J Six & P Stahl. 2006. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microb. Ecol.* 51, 404–411.
- Neumann, D; A Heuer; M Hemkemeyer; R Martens & CC Tebbe. 2013. Response of microbial communities to long-term fertilization depends on their microhabitat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 71–84.
- Qin, S; C Hu; X He; W Dong; J Cui & Y Wang. 2010. Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservation versus traditional agricultural management. *Appl. Soil Ecol.* 45, 152–159.
- Raper, RL; DW Reeves; CH Burmester & EB Schwab. 2000. Tillage depth, tillage timing, and cover crop effects on cotton yield, soil strength, and tillage energy requirements. *Appl. Eng. Agric.* 16, 379.
- Roldán, A; JR Salinas-García; MM Alguacil & F Caravaca. 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. *Appl. Soil Ecol.* 30, 11–20.
- Ruijter, JM; S Lefever; J Anckaert; J Hellemans; MW Pfaffl; V Benes; SA Bustin; J Vandesompele & A Untergasser. 2015. RDML-Ninja and RDMLdb for standardized exchange of qPCR data. *BMC Bioinformatics* 16, 197.
- Salinas-Garcia, JR; FM Hons & JE Matocha. 1997. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 152–159.
- Sessitsch, A; A Weillharter; MH Gerzabek; H Kirchmann & E Kandeler. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4215–4224.
- Six, J; ET Elliott & K Paustian. 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099–2103.
- Six, J; SD Frey; RK Thiet & KM Batten. 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 555–569.
- Stemmer, M; MH Gerzabek & E Kandeler. 1998. Organic matter and enzyme activity in particle-size fractions of soils obtained after low-energy sonication. *Soil Biol. Biochem.* 30, 9–17.
- Tiemann, LK; AS Grandy; EE Atkinson; E Marin-Spiotta & MD McDaniel. 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. *Ecol. Lett.* 18, 761–771.
- Tisdall, JM & JM Oades. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Jou. Soil Sci.* 33, 141-163.
- Trivedi, P; M Delgado-Baquerizo; TC Jeffries; C Trivedi; IC Anderson; M McNee; K Flower; B Pal Singh; D Minkey & BK Singh. 2017. Soil aggregation and associated microbial communities modify the impact of agricultural management on carbon content. *Environ. Microbiol.*, 19, 3070-3086.
- Zabaloy, MC; RM Lehman; SD Frey & JL Garland. 2008. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2960–2969.