

Proteínas totales y perfiles SDS-PAGE de suelos agrícolas bajo fertilización mineral

Romina A. Verdenelli¹⁻², Gisela D. Mascanfroni¹⁻², María F. Dominchin¹⁻², Florencia M. Barbero²,
Silvina Vargas Gil³ y José M. Meriles¹⁻²

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV- CONICET) Córdoba, Argentina

²Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFyN) Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

³Instituto de Patología Vegetal (IPAVE-CIAP, INTA) Camino 60 cuerdas, Km 5,5 C.P. 5119 Córdoba, Argentina

Fecha de recepción del manuscrito: 07/08/2018

Fecha de aceptación del manuscrito: 15/02/2019

Fecha de publicación: 29/03/2019

Resumen— Los microorganismos son fundamentales para el mantenimiento de las funciones de suelos naturales y agrícolas. La identificación de proteínas del suelo podría proporcionar una valiosa información sobre las capacidades funcionales de los microorganismos que lo habitan y que están sujetos a diferentes condiciones de estrés. El estudio de las proteínas del suelo podría ser utilizado para caracterizar la respuesta de las comunidades microbianas a la aplicación de contaminantes, fertilizantes u otros cambios ambientales. El objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto de diferentes combinaciones de fertilizantes minerales en los perfiles proteínicos de un suelo agrícola propio de la región con mayor productividad del país. Los muestreos realizados en el presente estudio estuvieron bajo un sistema conservacionista de rotación de cultivos (maíz/soja) y siembra directa por más de 10 años. Se midió el contenido de proteínas totales y se realizaron perfiles proteicos SDS-PAGE. Se observaron, incrementos en el contenido de proteínas totales en los suelos fertilizados en relación al testigo. La aplicación de N alteró el perfil de bandas proteicas encontrado por SDS-PAGE, solo en los suelos con cultivo de superficie maíz.

Palabras clave— proteínas de suelo, fertilización mineral, SDS-PAGE

Abstract—The microorganisms are fundamental for the maintenance of the functions of natural and agricultural soils. In this sense, the identification of soil proteins could provide valuable information about the functional capacities of the microorganisms that inhabit it and that are subject to different stress conditions. The study of soil proteins could be used to characterize the response of microbial communities to anthropic disturbances as the application of contaminants, fertilizers or other environmental changes. The aim of this work was to determine the impact of different combinations of mineral fertilizers on the protein profiles of an agricultural land typical of the region with the highest productivity in the country. The samplings carried out in the present study were under a conservationist system of crop rotation (corn / soybean) and no till for more than 10 years. The total protein content was measured and SDS-PAGE protein profiles were made. Increases in the total protein content in the fertilized soils were observed in relation to the control. The application of N altered the profile of protein bands found by SDS-PAGE, only in soils with corn.

Keywords— soil protein, mineral fertilization, SDS-PAGE

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes inorgánicos, especialmente el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el azufre (S), no sólo sirven para mantener el rinde de los cultivos, sino que también son capaces de inducir importantes cambios en las propiedades químicas, físicas y microbiológicas del suelo (Belay et al., 2002). En cultivos de cosecha, la fertilización mineral incrementa el rendimiento y el porcentaje de proteína en grano, con una mayor eficiencia en el uso del agua.

Por otro lado, los microorganismos edáficos están involucrados en muchos procesos que promueven la salud de las plantas y la calidad de los suelos mediante la

producción de exoenzimas (Paul y Clark, 1996). Además, tienen la habilidad de degradar compuestos orgánicos y metabolizarlos, contribuyendo de especial manera al ciclado de nutrientes, que quedan disponibles para las plantas (Lin et al., 2004).

El N, P y S forman parte de la estructura proteica del suelo. Por este motivo, el agregado de fertilizantes minerales puede modificar el contenido y/o los perfiles de proteína en el suelo. El contenido de proteínas puede ser fácilmente estimado por métodos estandarizados (Lowry et al., 1951). Tradicionalmente, la respuesta al estrés a escala microbiana ha sido estudiada a nivel de procesos, en términos de números, tasas respiratorias y actividad enzimática. Sin embargo, según diversos autores, el contenido de proteínas en el suelo también puede utilizarse como indicador de la calidad edáfica y utilizarse para caracterizar la respuesta de las comunidades microbianas del suelo a cambios ambientales, tales como la anoxia, la

sequía y la aplicación de materia orgánica (MO) (Singleton *et al.*, 2003). En este sentido, Verdenelli *et al.* (2012) encontraron que la aplicación de vermicompost (abono obtenido de la actividad de lombrices epigeas alimentadas con desechos orgánicos), puede alterar los perfiles proteicos, tanto de suelos agrícolas como de pastizal. Dado que el N, P y S forman parte constitutiva de la estructura proteica, la aplicación de dichos nutrientes podría incrementar los contenidos de proteínas y/o modificar los perfiles proteicos del suelo. La identificación de proteínas que intervienen en los procesos metabólicos de los ecosistemas podría proporcionar información sobre las capacidades funcionales de los microorganismos que habitan en una amplia variedad de hábitats y están sujetos a diferentes condiciones de estrés. (Morris *et al.*, 2010; Hettich *et al.*, 2013). Sin embargo, en la bibliografía científica consultada, no existen trabajos publicados respecto del efecto del agregado de fertilizantes minerales sobre los perfiles proteicos del suelo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto de la aplicación de diferentes combinaciones de fertilizantes minerales en el contenido de proteínas totales y en los perfiles proteínicos de un suelo agrícola bajo manejo conservacionista.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área experimental y características del ensayo

El ensayo pertenece a la red de ensayos de nutrición mineral, coordinada por CREA (Consortio Regional de Experimentación Agropecuaria). El ensayo se encuentra ubicado en Teodelina (departamento Gral. López), Santa Fe-Argentina (32°17'-34°10' S y 61°02'-63°00' O). Esta región se caracteriza por la presencia mayoritaria de suelos Hapludoles típicos (Molisol), aptos para la agricultura y con óptima capacidad de retención hídrica (aproximadamente 120 mm por metro de suelo) (SAGYP- INTA, 1989). No obstante, poseen cierta susceptibilidad a la compactación debido a los altos tenores de limo. El suelo utilizado en el presente trabajo fue clasificado como Franco-limoso, y contiene una alta proporción de limos (53.15%), arena (35.10 %) y arcilla (11,75%).

El ensayo fue inaugurado en el 2000 bajo un sistema conservacionista que incluyó rotación de cultivos (maíz/soja con trigo como cultivo invernal de cobertura) y siembra directa (SD). El ensayo fue realizado bajo un diseño a un factor en bloques completos al azar, con tres repeticiones. Las réplicas fueron parcelas de 25-30 m de ancho por 65-70 m de largo. Los tratamientos fueron NPS+micronutrientes (NPSm), NPS, NP, NS, PS y TE (tratamiento testigo, sin fertilizante). Las dosis de nutrientes aplicadas al ensayo fueron optimizadas a partir del rendimiento esperado del cultivo a fertilizar. Los tratamientos de fertilización se realizaron anualmente, siempre sobre las mismas parcelas en todos los ensayos. Los fertilizantes fueron aplicados en pre-siembra o siembra, en mezclas físicas. Con la finalidad de evitar efectos fitotóxicos, la incorporación de los fertilizantes se realizó a una distancia prudencial de la semilla de al menos 5 cm. La fertilización de soja se realizó durante el cultivo antecesor (trigo) con el N necesario para trigo, y el P y S necesarios para el trigo y la soja y se controló que el requerimiento nutricional de N de la soja fuese cubierto por la fijación

biológica de N. Se utilizaron dosis de N no limitantes para alcanzar los rendimientos esperados, estimadas a partir de la información zonal. Las aplicaciones de P y S se realizaron con dosis estimadas para la reposición de la extracción de estos nutrientes en grano (más un 10%). Para realizar la fertilización de N (solo en maíz) se utilizó urea (CO (NH₂)₂), para P se utilizó fosfato monoamónico ((NH₄) H₂ PO₄), y para azufre la formulación comercial Azufertil 19% (CaOSO₄ MgO).

Debido a este diseño, las variaciones entre bloques no contribuyen al error experimental y, en consecuencia, la precisión del experimento incrementa como resultado del control del error. Dado que el ensayo fue realizado a campo, las condiciones climáticas pudieron ser cambiantes a lo largo de los años de muestreos, afectando a corto plazo a los parámetros microbianos y químicos analizados en este estudio. Por este motivo, se incorporó al modelo estadístico el efecto "Campaña" como factor aleatorio.

Los muestreos se realizaron durante cuatro campañas consecutivas: 2010-2011 (cultivo de superficie maíz), 2011-2012 (soja), 2012-2013 (maíz), 2013-2014 (soja). La extracción del suelo fue efectuada en la zona cercana a la raíz de cada cultivo, con una profundidad de 0-10 cm. El muestreo consistió en la toma en cruz de 6 sub-muestras (estaciones de muestreo) de cada parcela/réplica. Con la unificación de las 6 estaciones de muestreo se conformó una muestra compuesta, representativa de cada parcela/réplica.

Proteínas totales y perfiles proteicos

Las proteínas totales del suelo fueron extraídas de acuerdo al "snap freeze method" propuesto por Singleton *et al.* (2003). Muestras de 0.8 gr de suelo fueron pesadas dentro de tubos de centrifuga con el agregado de 100 µL de un inhibidor de proteasa (SIGMA P2714) y 1 mL de buffer de extracción. La solución de buffer contuvo 50 mM de Tris-HCl, 10% de sacarosa, 2 mM de ditiotreitól (DTT), 4 mM de EDTA, 0.1% de Brij 58 con un pH final de 7.6. Con la finalidad de producir lisis celular, los tubos de centrifuga fueron sometidos a 4 ciclos de frío-temperatura ambiente con nitrógeno líquido y baño termostático a 25°C. Posteriormente, la solución fue centrifugada dos veces a (14000 rpm) a 4°C durante 30 min. El sobrenadante fue colectado después de cada centrifugación. El precipitado proteico fue inducido con el agregado de acetona (1.5 mL de solución fueron mezclados con 3.6 mL de acetona a 4°C). Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951). Brevemente, 100 µL de las proteínas en solución se mezclaron con 1mL de reactivo de Lowry. La solución resultante fue homogeneizada y almacenada en oscuridad durante 30 min. Luego se agregó 100 µL de reactivo de Folin diluido en agua (1:1) y se dejó reaccionar durante 1 h. Las proteínas totales fueron medidas en un espectrofotómetro (PE) a 750 nm.

Para las corridas electroforéticas se utilizaron geles de poliacrilamida con el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en "slab" de 8.5 x 10 cm, con un gel de concentración (stacking gel) del 3% y un gel de separación del 10%. El buffer de corrida fue Tris-glicina pH 8.3. En cada puesto del gel se sembró una concentración conocida de proteínas en presencia de una solución de SDS (2%), glicerol (10%), 2-mercaptoetanol (5%) y azul de bromofenol (0.002%). La electroforesis fue conducida a

corriente constante de 20 mA durante 2-3 hs. Los pesos moleculares de las bandas de proteínas fueron determinados mediante una corrida simultánea con proteínas de peso molecular estándar de Bio-Rad Co (Hércules, CA). La tinción de las bandas de proteína en el gel se realizó con sales de plata.

Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2017). Las diferencias entre tratamientos del suelo fueron determinadas mediante un análisis de varianza (ANAVA) bajo el marco de modelos lineales, generales y mixtos. El análisis de datos se realizó bajo un diseño a un factor fijo (fertilizantes), con “bloques” y “campañas” como variables aleatorias, y particionado por “cultivo”. Para evaluar diferencias entre tratamientos se realizó un test de comparaciones múltiples (LSD; $p \leq 0.05$). El cumplimiento del supuesto de normalidad de los datos fue testeado (Shapiro-Wilks modificado). Los resultados mostrados se expresan como las medias de las dos campañas para cada cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los métodos proteómicos usualmente se ven entorpecidos por la dificultad de extraer con pureza las proteínas del suelo. La mayoría de los protocolos para extraer proteínas del suelo han mostrado un éxito modesto y han logrado recuperaciones bajas de proteínas (Chen et al., 2009; Chourey et al., 2010). Bastida *et al.* (2014) compararon el rendimiento proteico obtenido a partir de diferentes métodos de extracción reportando que la eficiencia de la extracción se encuentra asociada con el método extractivo y el tipo de suelo utilizado en el análisis. A partir de los resultados reportados por Bastida *et al.* (2014), y teniendo en cuenta las características edáficas del presente estudio, se determinó utilizar el método de extracción de Singleton, el cual permitió una mayor eficiencia en la extracción de las proteínas del suelo en comparación con otros métodos empleados. Tanto la eficacia de la lisis celular como la recuperación de un pool proteico poco contaminado (ácidos húmicos, ácidos fenólicos, etc.) constituyen pasos críticos para obtener un extracto en condiciones óptimas para su análisis (Maron et al., 2007), y así optimizar la resolución de los perfiles proteicos estimados por SDS-PAGE (Ogunseitan, 2006; Chen et al., 2009).

Los valores de proteína encontrados en los diferentes tratamientos analizados estuvieron entre 0.3 y 0.6 mg/g suelo, y entre 0.4 y 0.8 mg/g suelo durante los cultivos de maíz y soja, respectivamente. En ambos cultivos, los tratamientos fertilizados con N presentaron los mayores contenidos de proteínas totales (Fig. 1). Singleton et al. (2003) demostraron que las proteínas representan aproximadamente el 50% de la biomasa microbiana. De esta manera, el mayor contenido de proteínas hallado en el suelo fertilizado podría estar relacionado con una mayor abundancia y/o diversidad microbiana en comparación con el tratamiento testigo (TE). Se conoce, que la aplicación de fertilizantes minerales (tanto la dosis como el número de fertilizantes aplicados) incrementan los niveles de nutrientes disponibles en el suelo, entre ellos, el carbono orgánico, aumentando directamente la actividad microbiana

y la biomasa microbiana (Zhang et al., 2015; Li et al., 2016). La aplicación de fertilizantes produce además incrementos en el rendimiento de los cultivos expresados a través de incrementos en la biomasa aérea (Dai et al., 2013; Zhang et al., 2014). En este sentido, la mayor biomasa aérea del maíz, consecuencia de la fertilización, pudo generar mayores devoluciones de MO al suelo, incrementando los niveles de proteínas totales encontrados, principalmente, en el tratamiento NPSm. En soja, como el aporte de N a los cultivos se realiza por fijación biológica y no por fertilización mineral, es de esperar que no se encuentren mayores diferencias entre los tratamientos nitrogenados. Por otro lado, el incremento en el contenido de proteínas totales observado en suelos fertilizados podría estar asociado directamente a la incorporación de N como fertilizante, ya que este nutriente resulta una parte constitutiva y esencial de los aminoácidos. Además, diversos autores observaron que la mayor parte del N (N^{15} incorporado al suelo como nitrato de potasio) dentro de la MO se encuentra presente en forma de amida, es decir, posiblemente como proteína (Almendros et al., 1991).

Los patrones electroforéticos se compararon visualmente sobre la base de diferencias en presencia/ausencia de bandas específicas. El perfil proteico durante el cultivo de maíz mostró una clara diferenciación de tratamientos en el patrón de bandeado. NPSm presentó 8 bandas, de pesos moleculares

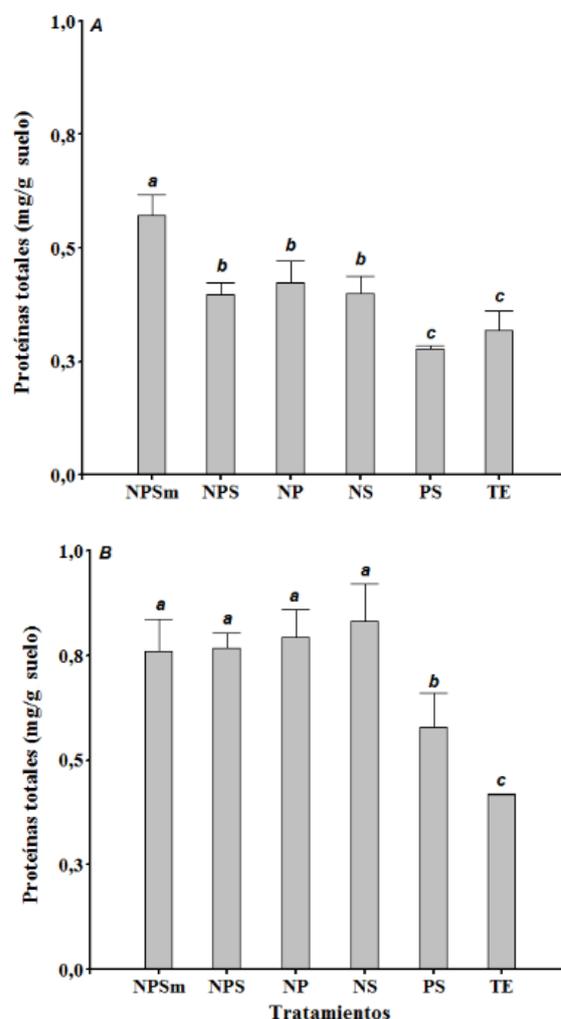


Fig. 1: Proteínas totales suelo. A: maíz; B: soja. NPSm (nitrógeno, fósforo, azufre y micronutrientes: boro, zinc, magnesio y cobre) NPS (fósforo, nitrógeno y azufre), NP (nitrógeno y fósforo), NS (nitrógeno y azufre), PS (fósforo y azufre) y TE (sin fertilizantes). Resultados con misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

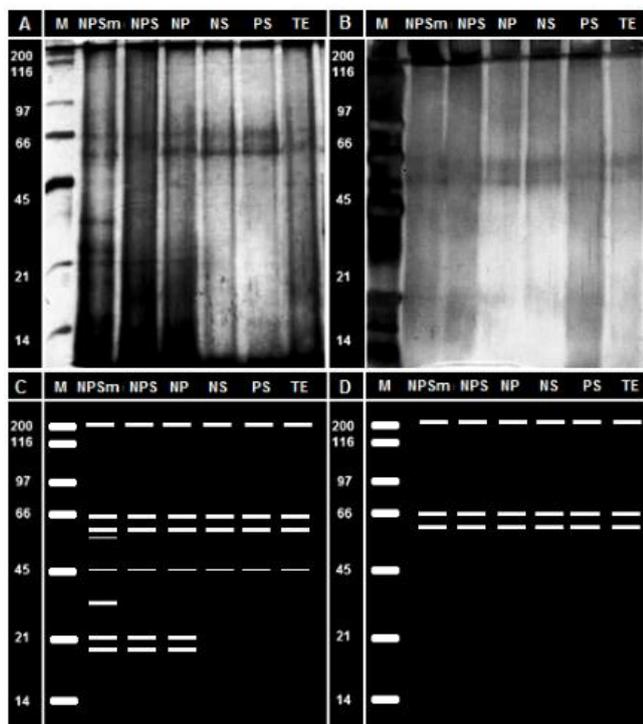


Fig. 2: Perfiles proteicos. Geles de poliacrilamida y diagrama esquemático. A y C: maíz; B y D: soja. NPSm (nitrógeno, fósforo, azufre y micronutrientes: boro, zinc, magnesio y cobre) NPS (fósforo, nitrógeno y azufre), NP (nitrógeno y fósforo), NS (nitrógeno y azufre), PS (fósforo y azufre), TE (sin fertilizantes), M (marcador de peso (kDa)).

muy variados, NPS y NP presentaron 6 bandas, y los tratamientos NS, PS y TE presentaron 4 bandas con pesos moleculares medianos y altos. La intensidad de las bandas en los tratamientos NPSm, NPS y NP fue superior a las respectivas bandas en los tratamientos NS, TE y PS (Fig. 2 A). El perfil proteico durante el cultivo de soja no presentó diferenciación clara en el patrón de bandeo ni tampoco en la intensidad de bandas entre los tratamientos (Fig. 2 B).

Taylor y Williams (2010) reportaron que una alta riqueza y diversidad de proteínas puede contribuir a un efecto de “arrastre” en los geles y a una consecuente disminución en la resolución del bandeo. Otros estudios han mostrado una rápida e irreversible adsorción de las proteínas a la arcilla en soluciones de suelo, generando inconvenientes en la observación del patrón de bandas (Benndorf *et al.*, 2007). Ogunseitán (1993) demostró que la baja resolución de las bandas puede deberse a la co-extracción de sustancias húmicas que se unen de forma no específica a la tinción de nitrato de plata. Los resultados hallados demuestran un mayor número de bandas de proteínas en los tratamientos triple fertilizados y NP durante el cultivo de maíz. Sin embargo, durante el cultivo de soja, se observó un patrón de bandeo similar en todos los tratamientos. En este sentido, Shingleton *et al.* (2003) propusieron que la falta de diferencias en el patrón de bandas puede deberse a un efecto de adsorción de las proteínas del suelo a componentes específicos de la MO, ocasionando una reducción de la resolución electroforética. Schulze *et al.*

(2005) realizaron una comparación entre suelos de distintos bosques, y observaron que cada ecosistema boscoso estuvo asociado a un grupo particular de proteínas del suelo. Este experimento sugiere que el tipo de vegetación es capaz de influir en la reserva de proteínas edáficas, posiblemente a través de cambios en la presencia y actividad de diferentes organismos. En este sentido, el uso de proteínas también tiene el potencial de revelar la identidad de los microorganismos activos presentes en un ecosistema. Por lo tanto, la presencia de proteínas específicas en muestras ambientales es un indicador potencialmente confiable para la determinación de la función microbiana (Benndorf *et al.*, 2007). La identificación de proteínas específicas y su asociación a ciertos microorganismos y actividades microbianas puede realizarse a través de la separación de las proteínas en geles seguida por digestión y la identificación por espectrometría de masas (MS) o la identificación mediante la comparación del banco de datos de la huella dactilar del péptido en masa (MAL-DI-ToF-MS) (Benndorf *et al.*, 2007). En el presente trabajo se observó que los cultivos de maíz y soja alteraron de manera diferencial los perfiles proteicos del suelo. De acuerdo a la bibliografía consultada, no existen antecedentes del efecto de los fertilizantes minerales ni de cultivos (tales como el maíz y la soja) sobre los perfiles proteicos y el contenido de proteínas totales en suelo. Los antecedentes generados en el presente trabajo podrían servir como punto de partida para futuras investigaciones vinculadas a la proteómica de suelos y áreas afines.

CONCLUSIONES

En ambos cultivos, los tratamientos con N presentaron el mayor contenido de proteínas totales. En cuanto a los perfiles proteicos, solo maíz evidenció diferencias en el bandeo proteómico. Los tratamientos nitrogenados presentaron un mayor número de bandas respecto de los otros tratamientos. Además, se observaron diferencias marcadas en el patrón de bandas entre los cultivos. Un conocimiento más profundo de la estructura, función y química de las proteínas recuperadas del suelo podría ser de gran importancia para esclarecer los mecanismos involucrados en dichas diferencias y permitiría diseñar métodos más eficaces de extracción. En este sentido, un abordaje meta proteómico, podría esclarecer los mecanismos involucrados en los cambios observados entre tratamientos e identificar las proteínas para asociarlas a los microorganismos presentes en cada tratamiento. Al mismo tiempo, el estudio de las proteínas del suelo podría colaborar en el entendimiento de las posibles respuestas de los microorganismos a diversos estímulos relacionados al manejo edáfico y ayudar a mejorar las prácticas de manejo hacia una agricultura más sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba por el apoyo económico recibido (307 201501 00013 CB), como así también a las siguientes instituciones FONCyT (PICT BID 2015 N°1035) y CONICET (PIP 11220150100061CO). Al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV - CONICET) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA – UNC), así como también a la Cátedra

de Química Orgánica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales -UNC- por poner a nuestra disposición las instalaciones para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Almendros G., Frund R., Gonzalez-Vila F.J., Haider K.M., Knicker H. y Ludemann H.D. (1991), "Analysis of 13C and 15N CPMAS NMR-spectra of soil organic matter and composts". *FEBS Letters*, 282: 119-121.
- [2] Bastida F., Hernández T. y Garcia C. (2014), "Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods". *Journal of Proteomics*, 101: 31–42.
- [3] Belay A., Claassens A.S. y Wehner F.C. (2002), "Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties, microbial components and maize yield under long-term crop rotation". *Biology and Fertility of Soils*, 35: 420-427.
- [4] Benndorf D., Balcke G.U., Harms H. y von Bergen M. (2007), "Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater". *ISME Journal*, 1: 224-234.
- [5] Chen W., Yen J., Chang C. y Wang Y. (2009), "Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil". *Ecotoxicology and environmental Safety*. 72: 120-127.
- [6] Chourey K., Jansson J., Verberkmoes N., Shah M., Chavarria K.L., Tom L.M., Brodie E.L. y Hettich R.L. (2010), "Direct Cellular Lysis / Protein Extraction Protocol for Soil Metaproteomic research articles". *Journal of Proteome Research*, 9: 6615-6622.
- [7] Dai Y., Di H.J., Cameron K.C. y He J.Z. (2013). "Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on ammonia oxidizers and N₂O emissions in a grazed pasture soil." *Science of the Total Environment*, 465: 125–135.
- [8] Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. (2016), "InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat", FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- [9] Hettich R.L., Pan C., Chourey K. y Giannone R.J. (2013), "Metaproteomics: harnessing the power of high performance mass spectrometry to identify the suite of proteins that control metabolic activities in microbial communities". *Analytical Chemistry*, 85: 4203–4214.
- [10] Li M., Nie H.G., Zhang S.H., Zhou F., Han D.D., Zhan L.Y., Tian Y.Y., Shi M. y Zhang E.P. (2016). "Correlation between FDA enzyme activity and soil fertility under combining application organic and nitrogen fertilizer in facility vegetable field". *Acta Horticulturae*. 43: 907–917.
- [11] Lin X.G., Yin R., Zhang H.Y., Huang J.F., Chen R.R. y Cao Z.H. (2004), "Changes of soil microbiological properties caused by land use changing from rice-wheat rotation to vegetable cultivation". *Environmental Geochemistry and Health*, 26: 119-128.
- [12] Lowry O.H., Rosebrough N.J. y Farr A.L. (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- [13] Maron P.A., Ranjard L., Mougél C. y Lemanceau P. (2007), "Metaproteomics: A new approach for studying functional microbial ecology". *En Microbial Ecology*, pp 486-493. Springer-Verlag.
- [14] Morris R.M., Nunn B.L., Frazar C., Goodlett D.R., Ting Y.S. y Rocard G. (2010), "Comparative metaproteomic reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction". *ISME Journal*, 4: 673–85.
- [15] Ogunseitán O.A. (1993), "Direct extraction of proteins from environmental samples". *Journal of Microbiological Methods*, 17: 273-281.
- [16] Ogunseitán, O.A. (2006). "Soil proteomics: Extraction and analysis of proteins from soils". En *Soil Biology. Nucleic Acids and Proteins in Soil*, pp 95-115. Ed. Nannipieri P, Springer-Verlag Berlin.
- [17] Paul E. y Clark F. (1996), "Soil Microbiology and Biochemistry". *Academic Press, Second Edition*, pp 340. San Diego.
- [18] SAGYP-INTA. (1989), "Mapa de Suelos de la Provincia de Buenos Aires". En secretaría de agricultura, ganadería y pesca, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. CIRN. Instituto de Evaluación de Tierras, pp 472 escala 1, 500000. Eds. Proyecto PNUD ARG 85/019.
- [19] Schulze W.X., Gleixner G., Kaiser K., Guggenberger G., Mann M. y Schulze E.D. (2005), "A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles". *Oecologia*, 142: 335-343.
- [20] Singleton I., Merrington G., Colvan S. y Delahunty J.S. (2003), "The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination". *Applied Soil Ecology*, 23: 25-32.
- [21] Taylor E.B. y Williams M.A. (2010), "Microbial protein in soil: Influence of extraction method and C amendment on extraction and recovery". *Microbial Ecology*, 59: 390-399.
- [22] Verdenelli R.A., Lamarque A.L. y Meriles J.M. (2012), "Short-term effects of combined iprodione and vermicompost applications on soil microbial community structure". *Science of the Total Environment*, 414: 210-219.
- [23] Zhang B., Li Y., Ren T., Tian Z., Wang G., He X. y Tian C. (2014). Short-term effect of tillage and crop rotation on microbial community structure and enzyme activities of a clay loam soil. *Biology and Fertility of Soils*. 50: 1077–1085.
- [24] Zhang Q., Zhou W., Liang G., Sun J., Wang X. y He P. (2015). "Distribution of soil nutrients, extracellular enzyme activities and microbial communities across particle-size fractions in a long-term fertilizer experiment." *Applied and Soil Ecology*. 94: 59–71