

## COMUNIDADES MICROBIANAS AFECTADAS POR CAPTAN EN SUELOS BAJO DIFERENTES PRÁCTICAS DE MANEJO

Florencia Magalí Barbero<sup>1</sup>, Romina Aylén Verdenelli<sup>1\*</sup>, María Florencia Dominchin<sup>1</sup>, Carolina Pérez-Brandán<sup>2</sup>, Antonio Aoki<sup>3</sup>, Silvina Vargas Gil<sup>4</sup>, José Manuel Meriles<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET-UNC), Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (FCEFYN-UNC), Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Estación Experimental Agropecuaria Salta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA Salta), Cerrillos, Salta, Argentina

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), Córdoba, Argentina

<sup>4</sup> Instituto de Patología Vegetal, Centro de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IPAVE, CIAP – INTA), Córdoba, Argentina

### RESUMEN

La aplicación de fungicidas se ha vuelto un método recurrente en la agricultura moderna. Sin embargo, su frecuente aplicación podría inhibir procesos clave en los agroecosistemas, particularmente en el suelo. Captan es un fungicida de amplio espectro, organoclorado y no sistémico ampliamente utilizado en agricultura. El objetivo del trabajo fue evaluar como distintas dosis del fungicida captan, afectan la microbiota del suelo sometido a diferentes tipos de manejos, y con gradiente de deterioro asociado al contenido de materia orgánica del suelo (MOS). El ensayo se realizó en invernadero e incluyó suelos con tres tipos de manejo: área preservada con bosque nativo (L1), manejo conservacionista (L2) y manejo convencional (L3). Los tratamientos fueron: control (0X), dosis 1.0 mg/kg suelo (1X) y dosis 10 mg/kg suelo (10X). La toma de muestras se realizó 30 días posteriores a la aplicación de captan. Se evaluaron actividades enzimáticas relacionadas con los ciclos C, N y P, análisis de ácidos grasos fosfolípidos (PLFA) y cuantificación de genes de los ARN ribosomales (16S y 18S) para evaluar el impacto de captan en la estructura y actividades de las comunidades microbianas. Nuestros resultados mostraron incrementos en las actividades enzimáticas y la biomasa en los suelos L1 y a dosis 1X en relación al control, con excepción de gran-negativas que incrementan a dosis 10X. Sin embargo, la aplicación de dosis 10x produjo pérdidas de actividad y la biomasa microbiana en los tres tipos de suelos. Los menores valores de copias 16S y 18S ARNr se registraron en los tratamientos con fungicida. El ARNr bacteriano 16S no presentó diferencias entre los tratamientos en los suelos L3. En conclusión, el suelo L1, presentó mayor sensibilidad en la respuesta a captan en comparación con los suelos bajo manejo agrícola L2 y L3.

**Palabras clave:** estructura de comunidades microbianas; actividad enzimática; abundancia microbiana.

## MICROBIAL COMMUNITIES AFFECTED BY CAPTAN IN SOILS UNDER DIFFERENT MANAGEMENT PRACTICES

### ABSTRACT

The application of fungicides has become a recurring method of modern agriculture. However, its frequent application could inhibit key processes in agroecosystems, particularly in the soil. Captan is a broad-spectrum, organochlorine, non-systemic fungicide widely used in agriculture. This study aimed to evaluate how different dosages of the fungicide captan affect the microbiota of soil subjected to different types of ma-

\* Autor de contacto:  
rverdenelli@imbiv.unc.edu.ar

Recibido:  
11-10-22

Recibido con revisiones:  
17-02-23

Aceptado:  
22-02-23

nagement and with a degradation gradient associated with the soil organic matter (SOM) content. The trial was conducted in a greenhouse and included soils with three types of management: pristine forest soil (L1), 2:1 rotation (soybean-corn) under no-tillage management (L2), and soybean monoculture under conventional tillage management (L3). The treatments were: control (0x), dosage 1.0 mg/kg soil (1x), and dosage 10 mg/kg soil (10x). Sampling was carried out 30 days after the application of captan. Enzymatic activities related to C, N, and P cycles, phospholipid fatty acid profiles (PLFA), and a quantification method for ribosomal RNA gene copy numbers (16S and 18S) were evaluated to assess the impact of captan on the structure and activities of microbial communities. Our results showed increases in enzyme activities and biomass in L1 soils at 1x doses compared to the control, except for gram-negative bacteria that increased at 10x dosages. However, the application of 10x dosages produced losses in activity and microbial biomass in the three types of soil. The lowest values of 16S and 18S rRNA copies were registered in the treatments with fungicide. The 16S bacterial rRNA did not present differences between the treatments in the L3 soils. In conclusion, the L1 soil presented greater sensitivity in its response to captan compared to the L2 and L3 soils under agricultural management.

**Keywords:** microbial community structure; enzyme activity; microbial abundance.

### INTRODUCCION

Debido a la demanda mundial de productos agrícolas, la expansión de cultivos sobre ecosistemas naturales se ha incrementado en los últimos años (Lambin y Meyfroidt, 2010). Los cambios en el uso de la tierra y un aumento en la especialización del proceso de producción son algunos de los impulsores más importantes de la alteración de las propiedades del suelo (Maharjan et al., 2017; Vázquez et al., 2022; Verdenelli et al., 2019).

La aplicación de fungicidas se ha vuelto un método recurrente para el tratamiento de enfermedades fúngicas en los cultivos (Abbott y Beckerman, 2018; Gill y Garg, 2014). Sin embargo, diversos autores reportaron que la aplicación frecuente de fungicidas puede inhibir procesos de importancia clave en los agroecosistemas, particularmente en el suelo, reduciendo poblaciones microbianas y/o generando pérdida de diversidad estructural y/o cultivos (Abbott y Beckerman, 2018; Gill y Garg, 2014). Por este motivo, conocer en detalle los factores y procesos que determinan el destino de los plaguicidas en el suelo permitiría controlar sus efectos adversos sobre la calidad del ambiente (Pal et al., 2005). Particularmente los fungicidas, presentan un comportamiento en el ambiente-suelo regido por la transformación y degradación de sus moléculas mediante procesos químicos (adsorción/desorción), fotoquímicos o microbiológicos (Gavrilescu, 2005). Algunos autores han observado que la materia orgánica del suelo (MOS) es un factor clave en los procesos de adsorción, y que existe una correlación positiva entre la tasa de adsorción del fungicida y el contenido de MOS (Bailey y White, 1964; Spark y Swift, 2002; Tortella et al., 2019). Las prácticas de manejo agrícola pueden afectar el contenido de MOS (Dominchin et al., 2019, 2021; Vázquez et al., 2022). En efecto, la variación en el contenido de MOS ha sido estudiada debido a su respuesta rápida y sensible frente a diversos disturbios (Vergnoux et al., 2011). Una reducción significativa de la MOS puede ser un indicio certero de pérdida de calidad del suelo y/o de su fertilidad (Dominchin et al., 2021; Maharjan et al., 2017; Prashar y Shah, 2016). En este sentido, el efecto de los fungicidas podría incrementarse en suelos con menor contenido de MOS, ya que, al ser menos adsorbidos, se encontrarían más disponibles en el suelo provocando pérdida de biodiversidad en ecosistemas de suelo y agua (Fernandes et al., 2006; Hashimi et al., 2020).

Captan ( $C_9H_8Cl_3NO_2S$ ) pertenece al grupo ftalimida y se define como un fungicida organoclorado multisitio con tiol-reactividad, no sistémico y con un mecanismo de acción relacionado con la supresión de la síntesis de proteínas eucariotas. A pesar de controlar eficazmente diversos patógenos fúngicos como *Botrytis*, *Fusarium*, *Fusicoccum*, *Pythium*, captan ha sido clasificado como carcinógeno para humanos desde 1999 por la USEPA (United State Environmental Protection Agency) (Hamed et al., 2022). Captan tiene una baja persistencia en el suelo, con una vida media de 1 a 10 días en la mayoría de los ambientes del suelo (Howard, 2017). Sin embargo, algunos trabajos reportaron persistencia de hasta 30 días según el tipo de suelo o la combinación con fertilizantes (Ekmekyapar y Devci, 2008). Además, la investigación de Satyavani et al. (2012), mostró que la degradación de los principios activos de captan podría generar productos más peligrosos que sus componentes iniciales. En este sentido, captan puede afectar negativamente la biomasa y/o actividad de microorganismos del suelo no objetivo, como bacterias, estreptomicetos y levaduras debido a su modo de acción no específico sobre los compuestos de tiol en las células (Chen et al., 2001; Piotrowska-Seget et al., 2008; Scariot et al., 2017). En adición, se observó que captan suprimió el crecimiento bacteriano edáfico a dosis excesivas (Rousk et al., 2009), retardó drásticamente la actividad microbiana

y cambió significativamente la dinámica del nitrógeno en el suelo (Piotrowska-Seget et al., 2008). Los microorganismos se han utilizado como indicadores sensibles de la calidad del suelo ya que pueden responder inmediatamente a diferentes tipos de perturbaciones, como las asociadas con las prácticas de manejo agrícolas (Pérez-Brandán et al., 2014; Shao y Zhang, 2017). Gu et al. (2010) y Vuyuru et al. (2018) estudiaron los efectos potenciales de los pesticidas sintéticos en la comunidad microbiana, utilizando análisis de ácidos grasos fosfolípidos (PLFA) y huellas moleculares, y observaron efectos significativos pero transitorios de la aplicación de fungicidas en el suelo. Las alteraciones en la comunidad microbiana edáfica pueden resultar en cambios significativos en la fertilidad del suelo y pérdidas en el crecimiento de los cultivos (Garbeva et al., 2004). Por este motivo, en la mayoría de las situaciones, el estudio de las actividades enzimáticas del suelo y la estructura de la comunidad microbiana constituye una alternativa prometedora para monitorear la sostenibilidad de la implementación de estrategias de manejo (Epelde et al., 2014). Varios estudios indicaron que la composición microbiana y la actividad enzimática fueron modificadas cuando los microorganismos se exponen a altas dosis de pesticidas, particularmente fungicidas (Kalia y Gosal, 2011; Verdenelli et al., 2012; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2017). La interacción de los fungicidas con los microorganismos del suelo resulta de gran importancia en la determinación del grado de contaminación ambiental y en el impacto sobre el funcionamiento de los ecosistemas (Karpouzias et al., 2016). Teniendo en cuenta los diferentes tipos de fungicidas, las dosis de aplicación y los tipos de suelo, todavía existe una falta de consenso sobre el impacto de estos en la comunidad microbiana del suelo y sus procesos metabólicos, fomentando un creciente interés en estudiar su influencia en los microorganismos del suelo que no son el objetivo (Ding et al., 2019; Meena et al., 2020). Los estudios que evalúan los efectos secundarios de los fungicidas sobre los microorganismos no blanco y los procesos ecológicos claves de suelos sometidos a diferentes niveles de manejo son limitados. Muchos estudios se enfocan en el efecto de diferentes dosis de fungicidas sobre un taxón microbiano particular de ambientes agrícolas o de ambientes acuáticos como las microalgas (Scariot et al., 2017; Satyavani et al., 2012;). Esta investigación fue diseñada para estudiar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana y las actividades enzimáticas debido a la aplicación de un fungicida de amplio espectro en un suelo bajo un gradiente de degradación edáfica asociado al contenido de MOS. Nuestros objetivos fueron evaluar i) cómo responde la comunidad microbiana a diferentes dosis de captan, y ii) cómo la aplicación de captan afecta la microbiota del suelo bajo diferentes grados de degradación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo de suelo

Las muestras de suelo fueron colectadas de tres sitios colindantes, ubicados a 5 km al sur de la ciudad de Córdoba, Argentina. El área posee un clima semiárido con un promedio de 700 mm de precipitación anual, suelos Haplustoles típicos y de textura franco-limosa. El suelo de esta área incluyó tres niveles de manejo: L1) Testigo: suelo prístino (31°37'20.25''S 64°18'6.37''W); L2) Conservacionista: diez años de rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa (SD) (31°37'17.76''S 64°17'45.31''W) y L3) Convencional: trece años de monocultivo de soja bajo labranza convencional (31°37'9.00''S 64°17'21.17''W) (Fig. 1). La historia de manejo de estos suelos se ha reportado en un estudio anterior (Dominchin et al., 2020). Estos sitios nunca han recibido aplicaciones de captan. El gradiente de deterioro edáfico fue categorizado en función del contenido de MOS (Manlay et al., 2007). Las propiedades físicoquímicas de las muestras de suelo se muestran en la Tabla 1. Las muestras de suelo fueron colectadas durante el cultivo de soja (cultivo presente en los dos tipos de manejo). Se tomaron tres muestras compuestas por sitio. Cada muestra compuesta consistió en la toma de 9 puntos de suelo del horizonte superficial (0-15 cm) con un barreno manual de la zona central de las parcelas evitando los bordes para constituir una muestra representativa de cada sitio. El suelo se transportó al laboratorio en una hielera y luego fue tamizado (2 mm de poro) para eliminar los residuos orgánicos visibles.

### Fungicida y diseño experimental

Los suelos L1, L2 y L3 fueron tratados con la formulación comercial del fungicida Captan (Rovral 50 WP, CAS No.133-06-2). El experimento fue llevado a cabo en invernadero, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (24°C y 60% capacidad de campo) en macetas plásticas de 500 g. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. La dosis de aplicación se determinó con base en tasas de aplicación recomendadas de campo (1x) (1.0 mg/kg suelo) y diez veces estas dosis (10x). Los suelos de control (0x) se rociaron con una cantidad igual de agua desionizada (ddH<sub>2</sub>O) a la que se usó para aplicar los fungicidas. La conversión de la proporción de campo a mg de fungicida por kilo de suelo se calculó suponiendo que todo el fungicida aplicado termina en el suelo y se incorpora a los 5 cm superiores de la superficie del suelo. La dosis 10x se recomienda en pruebas de laboratorio para evaluar el efecto de una contaminación acci-

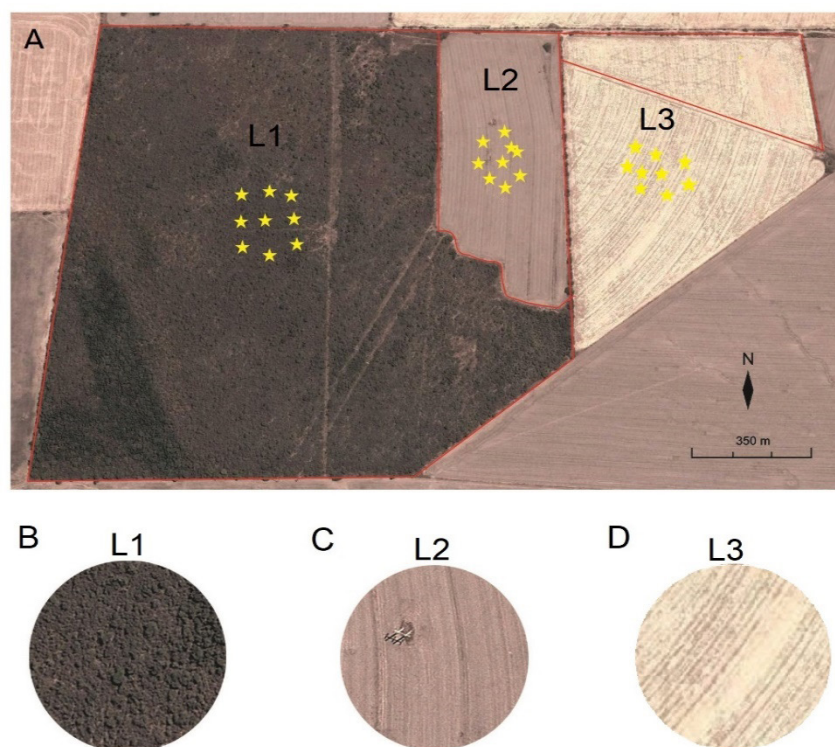
dental del suelo por una dosis sobrecargada de fungicida o derrames accidentales para analizar el efecto sobre la microflora del suelo (Sułowicz y Piotrowska-Seget, 2016). Antes del inicio del experimento, el suelo se equilibró durante 2 semanas. Los tratamientos fueron: L1 0x, L1 1x, L1 10x; L2 0x, L2 1x, L2 10x; L3 0x, L3 1x y L3 10x. Después de la aplicación de captan, los suelos se incubaron en invernadero durante 30 días. Se tomaron muestras de suelo para estudios microbiológicos 30 días después de la aplicación del fungicida (Podio et al., 2008; Verdenelli et al., 2012). Las muestras fueron almacenadas a 4°C para determinaciones químicas y de actividad enzimática y a -20°C para los análisis de estructura de las comunidades microbianas. La elección de dicho tiempo de incubación se corresponde con el plazo óptimo de respuesta microbiana a los diferentes fungicidas obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos (Verdenelli et al., 2012).

**Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas para cada manejo de suelo. Cada valor es la media de tres muestras compuestas y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre sitios (LSD;  $P < 0,05$ ). L1: Testigo (suelo bajo bosque nativo); L2: Rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa; L3: Monocultivo de soja bajo labranza convencional.

**Table 1.** Physical and chemical properties for each soil management. Each value is the mean of three composite samples and different letters indicate statistically significant differences between sites (LSD;  $P < 0.05$ ). L1: Control (soil under native forest); L2: Rotation 2:1 (soybean-corn) under direct sowing; L3: Soybean monoculture under conventional tillage.

| Características físico/químicas      | L1     | L2     | L3    |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Carbono orgánico (%)                 | 3,45   | 1,80   | 1,67  |
| Materia orgánica (%)                 | 5,95   | 3,10   | 2,88  |
| NT (%)                               | 0,26   | 0,15   | 0,15  |
| N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm) | 238,67 | 135,67 | 141   |
| N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm) | 69     | 47,45  | 48,45 |
| pH                                   | 7,45   | 6,82   | 6,52  |
| Conductividad (dS.m <sup>-1</sup> )  | 1,54   | 1,39   | 1,03  |

L1: Testigo (suelo bajo bosque nativo); L2: Rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa; L3: Monocultivo de soja bajo labranza convencional.



**Figura 1.** (A) Localización del área de estudio (31°19' lat. Sur; 64°13' long. Oeste) en Córdoba, Argentina. Vista satelital (Google Earth®) de las parcelas con diferente uso del suelo. Tres sitios pueden ser identificados: L1: suelo prístino L2: Conservacionista: diez años de rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa y L3: Convencional: trece años de monocultivo de soja bajo labranza convencional. Las estrellas amarillas muestran los sitios de muestreo. (B) Detalle del sitio L1. (C) Detalle del sitio L2. (D) Detalle del sitio L3.

**Figure 1.** (A) Location of the study area (31°19' lat. South; 64°13' long. West) in Córdoba, Argentina. Satellite view (Google Earth®) of the plots with different land use. Three sites can be identified: L1: pristine soil L2: Conservationist: ten years of 2:1 rotation (soybean-corn) under no-tillage (SD) and L3: Conventional: thirteen years of soybean monoculture under conventional tillage. The yellow stars show the sampling sites. (B) Detail of the L1 site. (C) Detail of the L2 site. (D) Detail of the L3 site.

#### Actividad metabólica/funcional: Actividades enzimáticas total y específicas

**La actividad deshidrogenasa (DHA):** Fue determinada de acuerdo a Garcia et al. (1997) Brevemente, a 1 gr de suelo se le adicionaron 0.2 mL de INT (iodo-nitrotetrazolio) al 0.4% durante 24 hs a 28°C en oscuridad. El INTF formado (iodo-nitrotetrazolioformazan) fue extraído con 10 mL de metanol y medido en espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25 a 485 nm. La concentración de INTF se calculó utilizando la curva de calibración construida con patrones de 1 a 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

**La actividad microbiana total (FDA):** Esta actividad fue estimada por la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) usando el protocolo de Adam y Duncan, (2001). Brevemente se colocaron 2 g de suelo en un tubo para centrifuga, se agregaron 15 mL de buffer fosfato pH 7,6 y 0,2 mL de solución stock de FDA, se tapó y agitó en vortex. Se incubó a 30°C durante 30 min en un baño termostatzado. Se añadieron 15 mL de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) para detener la reacción y se agitó en vortex durante 5 min. Se dejó reposar 24 hs. El producto fue cuantificado en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 25 a 490 nm. La concentración de fluoresceína fue calculada mediante una curva de calibración construida con patrones de 1 a 6 µg.mL<sup>-1</sup>.

**Actividad β-glucoronidasa y fosfatasa:** Derivados de 4-Metilumbelliferona (4-MU-βD-Hidrato de glucurónido y 4-MU-fosfato) fueron usados como modelos de sustratos para β-glucoronidasa y para fosfatasa acorde con el ensayo de enzimas con sustratos múltiples (Stemmer, 2004). Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC Perkin Elmer), columna C-18 (HP-Hipersil), velocidad de caudal de 1 mL.min<sup>-1</sup> y horno a 40°C de temperatura. Los sustratos se estimaron con un detector UV a 320 nm (Dominchin et al., 2021).



**Actividad ureasa:** Fue determinada por el método propuesto por Kandeler y Gerber, (1988) levemente modificado. La técnica se basa en la determinación colorimétrica del amonio liberado de la incubación de suelo. Brevemente, 1 g de suelo fue incubado con una solución acuosa de urea 79,9 mM por 2 h a 37°C en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo con ClK 2M. Luego, el amonio producido reaccionó con dicloroisocianurato al 0,1% y salicilato produciendo una solución verde-azulada. Se cuantificó en espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 25 a 690 nm, donde la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de nitrógeno amoniacal.

**Estructura y biomasa taxonómica:** Perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA)

La estructura de taxones de las comunidades microbianas de suelo fue estudiada mediante sus perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA). La metodología de extracción y condiciones de análisis de los PLFA se realizó de acuerdo a Meriles et al. (2009). Brevemente, los lípidos del suelo fueron extraídos mediante una mezcla de cloroformo: metanol: buffer fosfato (1:2:0.8 v/v/v), y posteriormente fueron separados en un gradiente de polaridad mediante cromatografía en columna (Silicacid, Sil350-Sigma). Las fracciones de glicolípidos, lípidos neutros y lípidos polares (fosfolípidos) fueron eluidas con cloroformo, acetona y metanol, respectivamente. Finalmente, los fosfolípidos fueron metilados e inyectados en un cromatógrafo gaseoso Perkin-Elmer Clarus 600 equipado con una columna Elite-5 (Crossbond 5% difenil -95% dimetilpolisiloxano), detector de llama (FID) y detector de masa (MS) para su identificación y cuantificación. Para la cuantificación se utilizó un estándar interno (19:0), identificándose los ácidos grasos mediante una corrida previa de un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos (Bacterial Acid Methyl Esters mix, Supelco, Bellefonte, PA). La concentración total de PLFA se estimó mediante la sumatoria de todos los ácidos grasos de fosfolípidos identificados (Tabla 2) utilizándose como un estimador de la biomasa microbiana de cada taxón (Verdenelli et al., 2019).

**Tabla 2.** Ácidos grasos de fosfolípidos utilizados como biomarcadores para grupos específicos de microorganismos. En negrita los utilizados en el presente estudio.

**Table 2.** Phospholipid fatty acids used as biomarkers for specific groups of microorganisms. Those used in the present study are in bold.

| ORGANISMOS                             | BIOMARCADORES DE ÁCIDOS GRASOS DE FOSFOLÍPIDOS   |
|--|--|
| Bacterias Gram-negativa                | 16:1 $\omega$ 5c, 16:1 $\omega$ 7c, 16:1 $\omega$ 7t, 16:1 $\omega$ 9c, a16:0, <b>cy17:0</b> , 17:1 $\omega$ 8c, 18:1 $\omega$ 5c, <b>18:1<math>\omega</math>9c</b> , <b>18:1<math>\omega</math>9t</b> , <b>cy19:0</b> |
| Bacterias Gram-positiva                | i14:0, <b>i15:0</b> , <b>a15:0</b> , br16:0, i16:0, a17:0, i17:0, i18:0  |
| Bacterias (no específicas)             | <b>14:0</b> , <b>16:0</b> , <b>18:0</b>  |
| Actinobacterias                        | 10Me16:0, 10Me17:0, <b>10Me18:0</b>  |
| Hongos                                 | <b>18:2<math>\omega</math>6,9</b>  |
| Hongos micorrícicos arbusculares (HMA) | <b>16:1<math>\omega</math>5c</b>   |

**Extracción de ADN y análisis de la abundancia de bacterias y hongos totales mediante qPCR**

El ADN total del suelo se extrajo de 0,5 g de muestra de suelo utilizando un kit de extracción de ADN PuriPrep SUELO-kit (Highway®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron extracciones por triplicado para cada tratamiento. La calidad del ADN se determinó mediante observación en geles de agarosa al 1% (SYBR Safe; Invitrogen, Mulgrave, Australia).

Se determinaron los números de copias. g<sup>-1</sup> de suelo del gen 16S ARNr bacteriano (conjunto de cebadores 338F/534R) (Fierer y Jackson, 2005) y los números de copias. g<sup>-1</sup> de suelo del gen fúngico 18S ARNr (conjunto de cebadores SSU 1536/Fu 1851) (May et al., 2001) aplicando la metodología de Liu et al. (2009). Las reacciones de qPCR de 25 µl contenían 10 ng de ADN, 0,2 mg. mL<sup>-1</sup> de BSA, 0,2 µM de cada cebador, 12,5 µl de premezcla PerfeCTaSYBR@GreenFastMix@ROX (Quanta BioSciences, Inc.) y agua ultra pura hasta completar el volumen final. La reacción se llevó a cabo en un Line-Gene 9600 Plus mediante monitorización fluorométrica con SYBRGreen (Applied Biosystems). Se utilizaron controles positivos de ADN (*Pseudomonas aeruginosa*, 10 veces diluidos en serie) y controles sin templado (agua ultrapura). Las muestras se realizaron en una sola placa y por triplicado. Las curvas estándar se construyeron utilizando plásmidos de genes de los ARNr clonados (Takara) para bacterias y hongos utilizando un kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation). Los plásmidos se construyeron con fragmentos de la región 16S de *Bacillus sp.* para bacterias y del 18S *Rhizoctonia solani* para hongos, respectivamente. Las curvas estándar se generaron utilizando diluciones de 10 veces por triplicado de ADN de plásmido, con un rango de 2,07 × 10<sup>2</sup> a 2,07 × 10<sup>8</sup> copias para el gen ARNr bacteriano 16S y de 4,60 × 10<sup>2</sup> a 4,60 × 10<sup>8</sup> copias para el gen ARNr 18S fúngico, por ensayo. Las eficiencias de amplificación se calcularon utilizando la fórmula  $Eff = [10/(-1/slope)]$  (Hai et al., 2009). Se obtuvo una eficiencia de amplificación de cuantificación del 93% para el gen ARNr 16S bacteriano y del 99% para el gen ARNr 18S fúngico, con un valor de R<sup>2</sup> y una pendiente de 0,981 y -3,5021, y 0,995 y -3,345, respectivamente. Se realizó un análisis de la curva de fusión después de cada ensayo para confirmar la amplificación específica. La electroforesis en gel de agarosa (2%) se realizó adicionalmente en los productos de amplificación de PCR para verificar si se logró un tamaño apropiado.

La concentración del número de copias de ARNr para muestras desconocidas se calculó utilizando una ecuación de regresión que describe la relación lineal entre concentración (número de copias de ARNr) y el valor del umbral del ciclo (Ct) (Frasier et al., 2016). El número de copias = m \* (Ct) +b (donde "m" es la pendiente de la curva, "b" es la ordenada en el origen y "Ct" es el valor del umbral del ciclo). Luego se calcularon los valores del número de copias realizando la siguiente **fórmula**: N° copias = (ng del templado) \*6,023\*10<sup>23</sup> / longitud del plásmido pb \* ng/g \* g/mole bp (donde ng/g = 10<sup>9</sup> y g/mole of bp = 660) (Serri et al., 2022).

#### Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANAVA) bajo el marco de modelos lineales, generales y mixtos. El análisis de datos se realizó bajo un diseño a dos factores fijos (gradiente de deterioro edáfico y dosis de fungicida). Para evaluar diferencias entre tratamientos se realizó un test de comparaciones múltiples con diferentes niveles de significancia (LSD; p ≤0,05). El cumplimiento del supuesto de normalidad de los datos fue testeado en todos los casos (Shapiro-Wilks modificado).

Las relaciones entre las diferentes dosis de fungicida, el gradiente de deterioro edáfico, las variables de funcionalidad microbiana y estructura de comunidades microbianas fueron analizadas mediante análisis multivariado de componentes principales (ACP).

## RESULTADOS

### Actividad metabólica/funcional: Actividades enzimáticas total y específicas.

El ACP de las actividades enzimáticas reveló diferencias en la función de la comunidad microbiana (Fig. 2). CP1 explicó el 60,5% de la varianza, mientras que CP2 explicó el 20,5%, para un total acumulado del 81%. El gráfico indicó que L1 se separó de L2 y L3 a lo largo del eje 1. Esta separación se basó principalmente en la asociación con mayores valores de actividad enzimática FDA, DHA, β-glucuronidasa y ureasa en L1 en comparación con L2 y L3. Por otro lado, el CP2 separó a los suelos L2 de los L3, pero no tuvo influencia sobre L1. El eje 2 relacionó directamente a L3 con la actividad fosfatasa. Ninguno de los ejes del ACP diferenció claramente grupos en función de las dosis (Fig. 2).

Se observó un significativo efecto en la respuesta de las diferentes actividades microbianas en la interacción de los factores: dosis aplicadas y manejo del suelo (Tabla 3). Además, el impacto de captan en las diferentes actividades microbianas analizadas fue altamente significativo, en cada factor por separado; tanto para dosis del fungicida como para manejo del suelo (Tabla 3). Todas las actividades enzimáticas, con excepción de Fosfatasa presentaron valores de actividad significativamente mayores en los suelos L1 en relación a los suelos bajo manejo agrícola (Tabla 3). El nivel de deterioro L3, mostró valores significativamente más bajos de las actividades generalistas FDA y DHA y de la actividad β-glucuronidasa, relacionada al ciclo del carbono (Tabla 3). La aplicación de fungicida 10x produjo pérdidas significativas de las

actividades enzimáticas (con excepción de fosfatasa) en relación a las dosis 0x y 1x (Tabla 3). En general la actividad fosfatasa no presentó una respuesta concluyente sobre el efecto que ejerce captan en relación al nivel de manejo del suelo o a la aplicación del fungicida (Tabla 3).

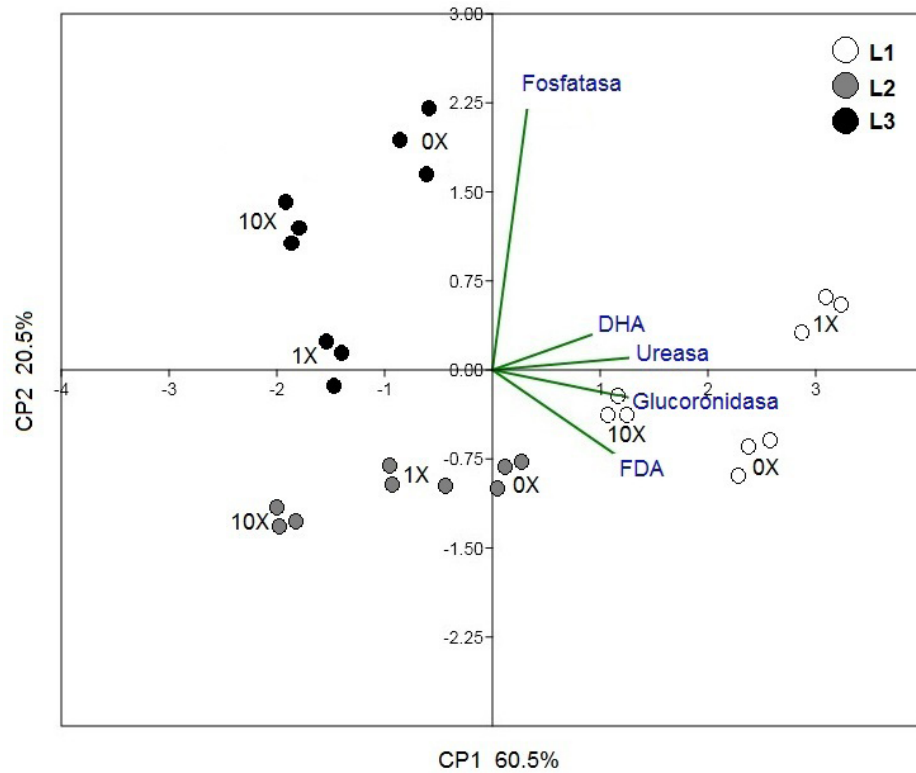
El efecto de cada dosis aplicada en función de cada nivel de manejo edáfico se observa en la Fig. 3. La actividad de la FDA presentó los mayores valores en el suelo L1. En los tres niveles de manejo edáfico, la aplicación de captan 1x aumentó significativamente la actividad de la FDA en comparación con el control 0x. En L1, los mayores valores de actividad se observaron con la aplicación de la dosis 10x, contrario a lo que se observó en L2 y L3 (Fig. 3A). Captan a dosis 10x redujo significativamente la actividad de la DHA en todos los niveles de manejo edáfico. La aplicación de captan 1x redujo significativamente la actividad DHA en los suelos L2 y L3 en relación a 0x. Sin embargo, en suelos L1, dicha dosis, incrementó significativamente DHA en relación a 0x (Fig. 3B). La actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa presentó los mayores valores en el suelo L1. La tendencia de respuesta a la aplicación de captan fue similar a la actividad DHA, las dosis 1X y 10X redujeron significativamente la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en relación a la dosis 0X tanto en L2 como en L3. Sin embargo, en los suelos L1 la aplicación de la dosis 1x presentó incrementos de actividad. (Fig. 3C). La actividad fosfatasa incrementó significativamente sus valores con la aplicación de captan en los suelos L1. Sin embargo, la respuesta de la fosfatasa a las aplicaciones de captan en los suelos L2 y L3 fue inconsistente. Los valores más elevados de actividad fosfatasa se observaron en suelo L3 bajo dosis 0x (Fig. 3D). La actividad ureasa presentó los mayores valores de actividad en el suelo L1. La aplicación de captan 10x disminuyó significativamente en los tres niveles de manejo edáfico en relación al control (Fig. 3E). La dosis 1x incrementó significativamente la actividad ureasa en el suelo L1 en relación al control. Sin embargo, en L2 disminuyó la actividad y en L3 no presentó diferencias significativas en relación a 0x (Fig. 3E).

**Tabla 3.** Análisis de la varianza del efecto del grado de deterioro edáfico y dosis de fungicida en diferentes actividades enzimáticas del suelo. FDA: actividad de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína; DHA: actividad deshidrogenasa; FOSFA: Actividad fosfatasa ácida; GLUCO: Actividad glucuronidasa; L1: Testigo (suelo bajo bosque nativo); L2: Rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa; L3: Monocultivo de soja bajo labranza convencional. Nota: Los asteriscos indican el nivel de significancia p (\*\*\*<0,001; \*\* <0,01; ns: no significativo).

**Table 3.** Analysis of variance results for the effect of degree of edaphic deterioration and dosage of fungicide in different enzyme activities of soil. FDA: fluorescein diacetate hydrolysis activity; DHA: dehydrogenase activity FOSFA: Acid phosphatase activity; GLUCO: Glucuronidase activity; L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management. Note: Asterisks indicate the level of significance p (\*\*\*<0.001; \*\*<0.01; ns: not significant).

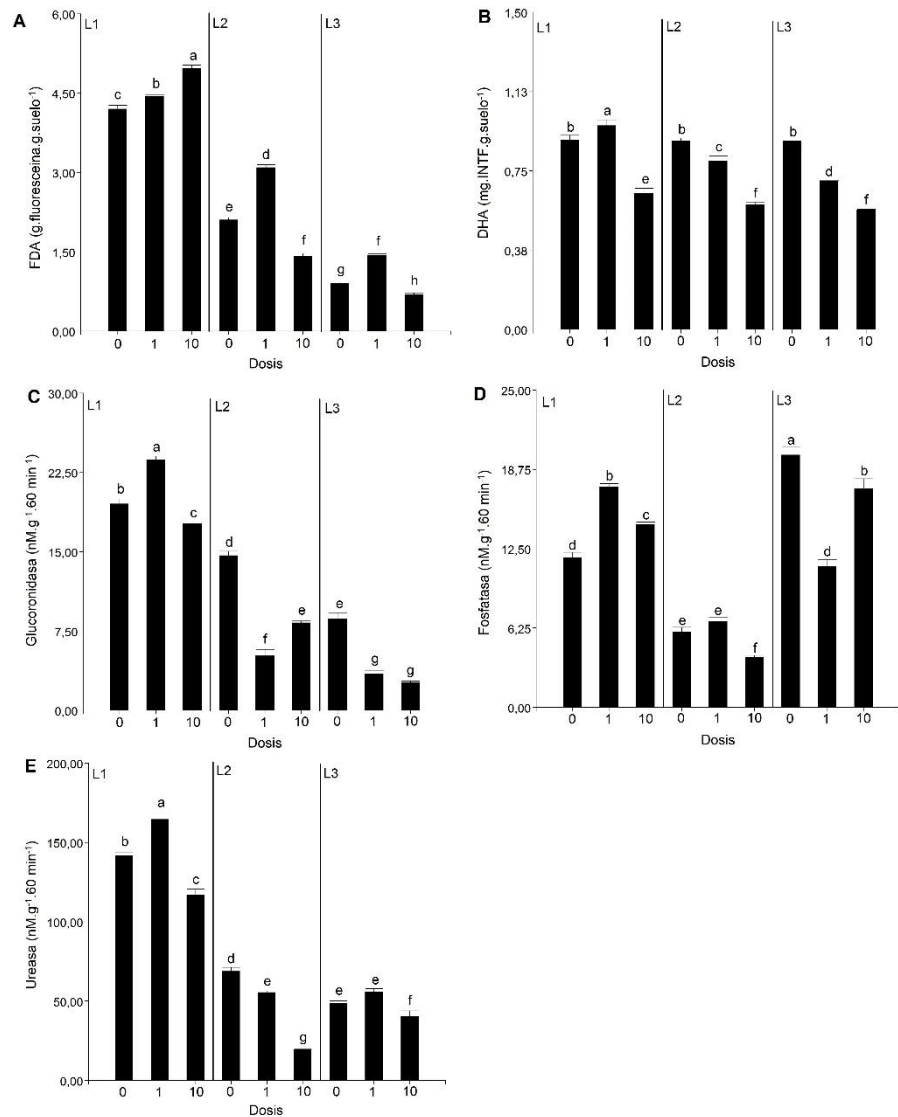
|                                    | FDA                    | DHA                    | UREASA                  | FOSFA                 | GLUCO                   |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Efectos principales                |                        |                        |                         |                       |                         |
| Grado de deterioro                 | 4183,68***<br>L1>L2>L3 | 34,79***<br>L1>L2>L3   | 1809,63***<br>L1>L3=L2  | 592,48***<br>L3>L1>L2 | 1244,15***<br>L1>L2>L3  |
| Dosis fungicida                    | 160,48***<br>1x>0x=10x | 228,28***<br>0x>1x>10x | 180,13 ***<br>1x>0x>10x | 4,59 **<br>0x>10x>1x  | 112,01 ***<br>0x>1x>10x |
| Dos vías                           |                        |                        |                         |                       |                         |
| Grado de deterioro*Dosis fungicida | 138,94 ***             | 14,49 ***              | 32,40 ***               | 97,57 ***             | 93,58 ***               |





**Figura 2.** Análisis de componentes principales (ACP) de las actividades enzimáticas en los diferentes usos del suelo y dosis de captan. L1: testigo (suelo bajo bosque nativo). L2: rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa. L3: monocultivo de soja bajo labranza convencional.

**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of enzyme activities in different land uses and captan dosages. L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management.



**Figura 3.** Análisis de actividades enzimáticas en respuesta a diferentes usos del suelo y dosis de captan. A: FDA (actividad de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína). B: DHA (actividad deshidrogenasa). C: Glucronidasa. D: Fosfatasa. E: Ureasa. L1: testigo (suelo bajo bosque nativo); L2: rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa; L3: monocultivo de soja bajo labranza convencional. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. (LSD; n=3; P<0,05).

**Figure 3.** Analysis of enzyme activities in response to different land uses and captan dosages. A: FDA (fluorescein diacetate hydrolysis activity). B: DHA (dehydrogenase activity). C:  $\beta$ -glucuronidase. D: phosphatase. E: Urease. L1: control (pristine forest soil); L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management; L3: soybean monoculture under conventional tillage management. Different letters indicate statistically significant differences between treatments. (LSD; n=3; P<0.05).

Estructura y biomasa taxonómica: Perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA).

El ACP reveló diferencias en la estructura taxonómica microbiana. El CP1 explicó un 49,9% y el CP2 un 23% de la variabilidad de los datos, para un total acumulado del 72,9% (Fig. 4). El CP1 separó al suelo L3 en sus tres dosis de L2 y L1 a dosis 0x y 1x. Esta separación se basó principalmente en la asociación de los suelos L1 y L2 a todos los taxones estudiados, con excepción de Gram-negativas que se asociaron con L3 a sus tres dosis. El CP2 no tuvo marcada influencia sobre la separación de los tratamientos.

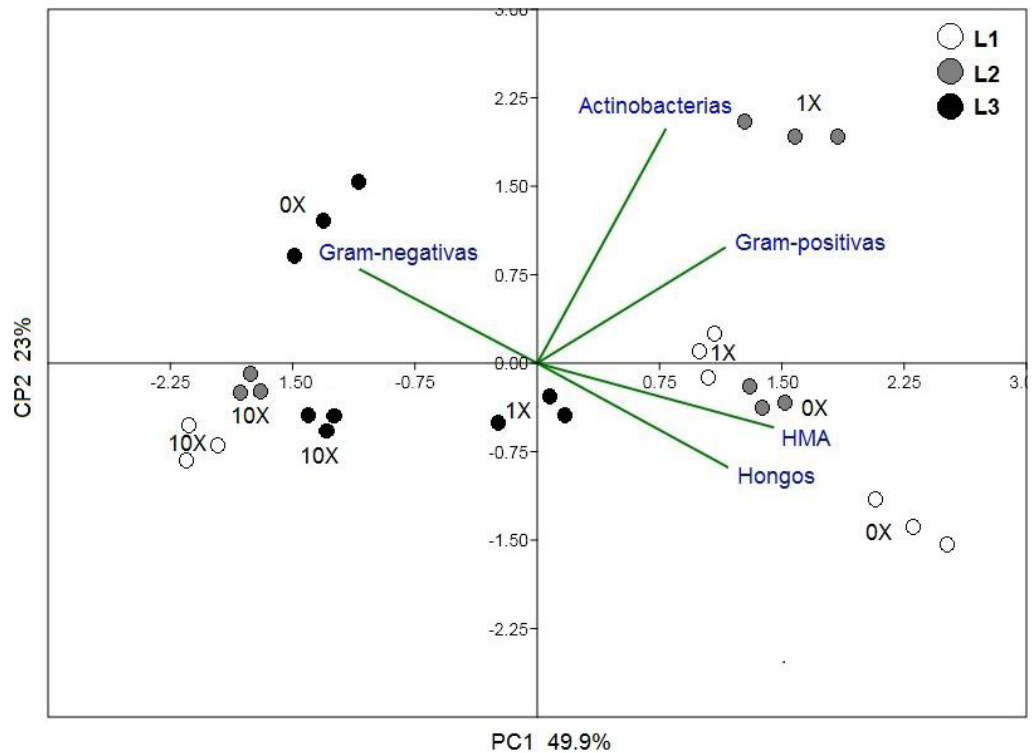
El efecto de captan en la abundancia de PLFA estuvo asociada particularmente a cada grupo taxonómico (Tabla 4). Las bacterias Gram-positivas mostraron incrementos significativos a dosis 1X en suelos con menor deterioro edáfico L1 y L2. La dosis 10x presentó los menores valores de abundancia de Gram-positivas en los tres manejos de suelo (Fig. 5A). La misma tendencia fue observada en Actinobacterias donde captan

10x disminuyó significativamente la abundancia del taxón, en todos los manejos (Fig. 5B). Contrariamente, el efecto de captan sobre Gram-negativas mostró incrementos significativos con dosis 10x en los suelos L1 y L2, y, en L3 una disminución significativa de la abundancia respecto al control (Fig. 5C). Tanto hongos como HMA (hongos micorrícicos arbusculares) presentaron mayor abundancia en los suelos L1 y a dosis 0x (Tabla 4). La aplicación de Captan 10x produjo una disminución significativa de la abundancia en los tres manejos de suelos en relación a la dosis 1x. No se encontraron diferencias significativas de la abundancia de hongos entre 0x y 1x en los suelos L2 y L3 (Fig. 5D). Sin embargo, la dosis 1x en el manejo L3 incrementó significativamente la abundancia HMA (Fig. 5E).

**Tabla 4.** Análisis de la varianza del efecto del grado de deterioro edáfico y dosis de fungicida en biomarcadores de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA). Actino: Actinomycetes; HMA: Hongos micorrícicos arbusculares; L1: Testigo (suelo bajo bosque nativo); L2: Rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa; L3: Monocultivo de soja bajo labranza convencional. Nota: Los asteriscos indican el nivel de significancia p (\*\*<0,001; \* <0,01; ns: no significativo).

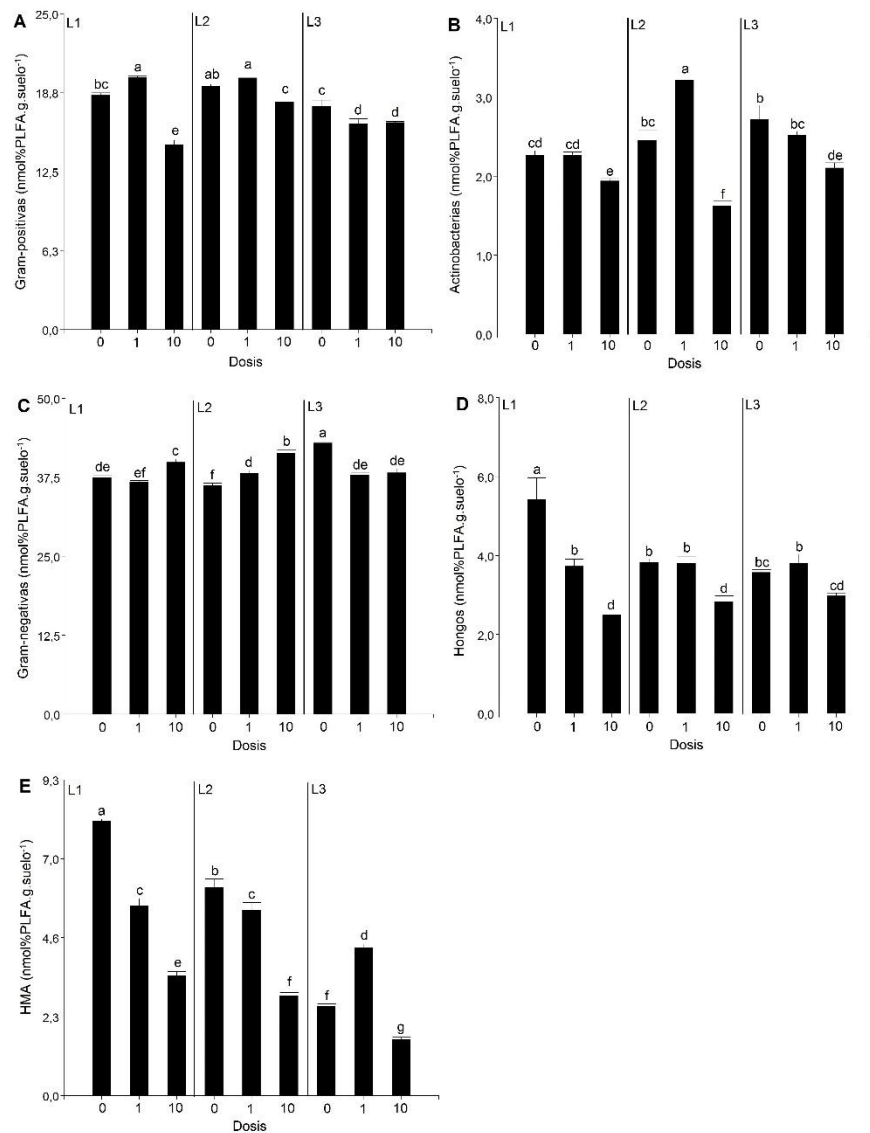
**Table 4.** Analysis of variance of the effect of the degree of edaphic deterioration and dosage of fungicide on biomarkers of phospholipid fatty acids (PLFA). Actin: Actinomycetes; AMF: arbuscular mycorrhizal fungi; L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management. Note: Asterisks indicate the level of significance p (\*\*<0.001; \* <0.01; ns: not significant).

|                                    | Bacterias Gram-positivas | Bacterias Gram-negativas | Actino                 | Hongos                 | HMA                     |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Efectos principales                |                          |                          |                        |                        |                         |
| Grado de deterioro                 | 44,05 ***<br>L2>L1>L3    | 6,9 ns                   | 21,95 ***<br>L2>L3>L1  | 18,52 ***<br>L1>L2=L3  | 284,98 ***<br>L1>L2>L3  |
| Dosis fungicida                    | 57,43 ***<br>1x=0x>10x   | 20,05 ***<br>10x>0x>1x   | 93,62 ***<br>1x>0x>10x | 62,79 ***<br>0x>1x>10x | 434,47 ***<br>0x=1x>10x |
| Dos vías                           |                          |                          |                        |                        |                         |
| Grado de deterioro*Dosis fungicida | 22,31 ***                | 36,94 ns                 | 40,24 ***              | 29,61 ***              | 81,25 ***               |



**Figura 4.** Análisis de componentes principales (ACP) de la estructura de la comunidad microbiana estimada por los perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA), en los diferentes usos del suelo y dosis de captan. HMA: hongos micorrízicos arbusculares. L1: testigo (suelo bajo bosque nativo). L2: rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa. L3: monocultivo de soja bajo labranza convencional.

**Figure 4.** Principal component analysis (PCA) of the microbial community structure estimated by the phospholipid fatty acids profiles (PLFA), in the different land uses and captan dosages. AMF: arbuscular mycorrhizal fungi. L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management.



**Figura 5.** Abundancia de grupos microbianos del suelo en respuesta a diferentes usos de la tierra y dosis de captan. A: bacterias gram-positivas; B: bacterias gram-negativas; C: actinobacterias. D: hongos; E: HMA (hongos micorrícicos arbusculares). L1: testigo (suelo bajo bosque nativo). L2: rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa. L3: monocultivo de soja bajo labranza convencional. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD;  $n=3$ ;  $P<0,05$ ).

**Figure 5.** Abundance of PLFA biomarkers of specific microbial groups in response to different land uses and captan dosages. A: gram-positive bacteria; B: gram-negative bacteria; C: actinobacteria. D: fungi; E: AMF: arbuscular mycorrhizal fungi. L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management. Different letters indicate statistically significant differences between treatments (LSD;  $n=3$ ;  $P<0.05$ ).

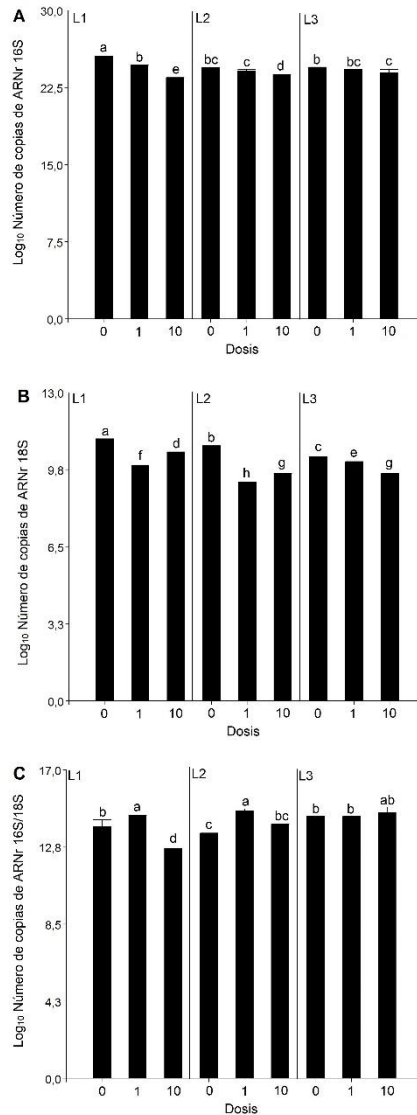
**Cuantificación de genes:** Análisis de la abundancia de bacterias y hongos totales mediante qPCR

El suelo L1 mostró  $3.10 \times 10^{27}$  copias.  $g^{-1}$  de genes de ARNr 16S a dosis 0x, siendo significativamente mayor al resto de los tratamientos. Cuando el fungicida se aplicó a dosis 10x, suprimió significativamente la abundancia de genes ARNr 16S bacterianos revelando valores de  $3.35 \times 10^{25}$ ,  $9.73 \times 10^{25}$  y  $3.39 \times 10^{26}$  copias.  $g^{-1}$  de genes ARNr 16S para L1, L2 y L3, respectivamente. La aplicación de dosis 1x en suelos L2 y L3 no presentó diferencias significativas con el control 0x (Fig. 6A).

La abundancia del gen ARNr 18S de los tratamientos 0x fue significativamente mayor que los tratamientos bajo dosis 1x y 10x para cada manejo observándose valores de  $6.50 \times 10^{11}$ ,  $5.98 \times 10^{11}$  y  $2.19 \times 10^{11}$  de genes ARNr 18S/ $g^{-1}$  para L1, L2 y L3, respectivamente (Fig. 6B). La aplicación de captan suprimió consistentemente el tamaño de la población fúngica y la inhibición aumentó en los tratamientos 1x con excepción del



suelo L3, donde 10x presentó los menores valores. Se calcularon las proporciones de las copias. g<sup>-1</sup> del gen ARNr 16S a 18S, que fue de  $4.74 \times 10^{15}$ ,  $7.9 \times 10^{14}$  y  $3.46 \times 10^{15}$  en los tratamientos 0x de L1, L2 y L3, respectivamente. De los tratamientos con fungicidas, solo 10x en L1 redujo significativamente la proporción de genes ARNr 16S a 18S a  $1.86 \times 10^{14}$ , que fue aproximadamente 1/25 del control. Por el contrario, se observó un aumento de 4 y 18 veces en los tratamientos con fungicidas 1x en los suelos L1 y L2, respectivamente (Fig. 6C).



**Figura 6.** Abundancia de microorganismos de suelo determinada por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en respuesta a diferentes usos del suelo y dosis de captan. A: Abundancia bacteriana (número de copias. g<sup>-1</sup> de ARNr 16S). B: Abundancia fúngica (número de copias. g<sup>-1</sup> del ARNr 18S). C: Proporción de genes ARNr 16S/18S. L1: testigo (suelo bajo bosque nativo). L2: rotación 2:1 (soja-maíz) bajo siembra directa. L3: monocultivo de soja bajo labranza convencional. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (LSD; n=3; P<0,05).

**Figure 6.** Abundance of soil microorganisms determined by quantitative real-time PCR (qPCR) in response to different land uses and captan dosages. A: Bacterial abundance (copy number of 16S rRNA). B: Fungal abundance (copy numbers of 18S rRNA). C: 16S/18S rRNA gene ratio. L1: control (pristine forest soil). L2: rotation 2:1 (soybean-corn) under no-tillage management. L3: soybean monoculture under conventional tillage management. Different letters indicate statistically significant differences between treatments (LSD; n=3; P<0.05).

## DISCUSIÓN

### Actividad metabólica/funcional

La actividad enzimática es un indicador consistente de los cambios que ocurren en el suelo y puede utilizarse potencialmente para evaluar la calidad y la fertilidad del suelo (Ye et al., 2018). Las enzimas extracel-

lulares son los principales catalizadores en la descomposición de la materia orgánica y están involucradas en numerosos procesos de ciclado de nutrientes del suelo (Burns et al., 2013). El ensayo FDA se utilizó para proporcionar una estimación de la actividad microbiana general en diferentes manejos del suelo. Nuestros resultados indicaron que FDA fue significativamente mayor en suelos L1, y a dosis recomendada para todos los manejos en relación al control. Diversos autores observaron que la actividad FDA incrementó 20-30 días posteriores a la aplicación de la dosis recomendada de diferentes fungicidas en relación al control en suelos agrícolas y de pastizales naturales (Verdenelli et al., 2012). En adición, ciertos grupos de microorganismos son capaces de utilizar metabolitos de los fungicidas como fuente nutricional para acelerar la síntesis de enzimas extracelulares (Shao y Zhang, 2017), existiendo una estrecha relación entre la cinética hidrolítica del FDA y la biomasa microbiana del suelo (Perucci, 1992).

La actividad DHA está asociada a los microorganismos proliferantes y es una de las enzimas encargadas de la oxidación biológica de los compuestos orgánicos del suelo. DHA juega un rol preponderante en el mantenimiento de la fertilidad y calidad de los suelos (Madejón et al., 2009). Los valores de DHA en los tratamientos bajo manejo agrícola mostraron pérdida de actividad con la aplicación de fungicidas. Similarmente, numerosos autores informaron disminuciones significativas en la actividad DHA del suelo con la aplicación de fungicidas (Bending et al., 2007; Guo et al., 2015; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2019). Medina, (2018), reportó que, en general, todas las actividades enzimáticas se correlacionaron positivamente con el contenido de MOS. Nuestros resultados mostraron que L1 presentó incrementos de la actividad a dosis recomendada. En estudios previos se observó que la aplicación de fungicidas puede incrementar la actividad debido a procesos relacionados con la desintoxicación celular, principalmente, en suelos prístinos con alto contenido de MOS y/o biomasa microbiana (Verdenelli et al., 2012). Como resultado de esto, los procesos fisiológicos de los microorganismos se alteran, generando modificaciones en la actividad de algunas enzimas (Tortella et al., 2013).

Las actividades específicas de las enzimas permiten conocer el estado microbiano del suelo. En este sentido, están marcadamente influenciadas por cambios en la comunidad microbiana que sintetizan las enzimas (Muñoz-Leoz et al., 2011). Nuestros resultados reportaron que las actividades enzimáticas estuvieron influenciadas por el manejo del suelo y por la dosis de captan aplicada. La dosis de captan 10x disminuyó las actividades de  $\beta$ -glucuronidasa y ureasa en relación al control 0x, principalmente en los suelos bajo manejo agrícola. Las actividades específicas  $\beta$ -glucuronidasa, fosfatasa y ureasa presentaron incrementos a dosis recomendada en relación al control 0x. Similarmente, Zhang et al., (2019), obtuvieron incrementos de actividades específicas a bajas dosis de fungicida en la etapa inicial de incubación (días 14 y 21). Por otro lado, Wightwick et al. (2013), reportaron que captan a dosis elevadas, generó disminución de la actividad ureasa y de las enzimas relacionadas al ciclo de C como la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Estos resultados, también fueron observados con la aplicación de otros fungicidas (Baćmaga et al., 2019; Guo et al., 2015; Muñoz-Leoz et al., 2011; Saha et al., 2016; Zhang et al., 2019). La transformación de pesticidas en el suelo puede lograrse a través de muchos procesos, pero los mecanismos biológicos catalizados por enzimas, como la oxidación, la hidrólisis, la reducción y la conjugación, se consideran los medios principales para lograrlo (Chowdhury et al., 2008). En general, el efecto residual de los pesticidas sobre los microorganismos tiende a variar con la dosis de aplicación, el tipo de suelo, el manejo y la cantidad de aplicaciones (Cycoń et al., 2010) mancozeb (MB). Se puede inferir que, cuando se aplica captan en dosis recomendadas, el fungicida tiende a ser neutral o menos tóxico para los microbios del suelo, así como para las funciones del suelo, pero el mismo pesticida puede volverse altamente tóxico con una dosis de aplicación mayor. Respecto a la actividad fosfatasa, se obtuvieron niveles altos de actividad, tanto a dosis recomendada como a dosis 10x principalmente en suelos prístinos. En este sentido, Satapute et al. (2019), reportaron aumentos de la actividad fosfatasa a dosis recomendadas de fungicidas en relación al control. Resultados similares fueron reportados por Jiang et al. (2022), donde la aplicación del fungicida clorotalonil, generó incrementos de la actividad en los suelos tratados con dosis tóxica a los 30 días de incubación. En general, los fungicidas actúan inhibiendo la proliferación de hongos, e incrementando así los posibles efectos indirectos sobre comunidad bacteriana del suelo (Muñoz-Leoz et al., 2011; Verdenelli et al., 2012). Megadi et al., (2010), descubrieron que una cepa de *Bacillus* sp. utilizó el fungicida captan como única fuente de carbono y energía degradando captan por una vía que involucra su hidrólisis inicial para producir cis-1,2,3,6-tetrahidroftalimida, un compuesto sin actividad fungicida. En este sentido, los fungicidas pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de carbono y nitrógeno, provocando incrementos en la secreción y actividad enzimática (Ullah et al., 2021; Zhang et al., 2019).

### Estructura y biomasa taxonómica

Los cambios en el ambiente del suelo causados por la presencia de fungicidas generalmente conducen a una reducción en la abundancia y diversidad de microorganismos (Podio et al., 2008; Verdenelli et al., 2012). Sin embargo, el impacto de estos, sobre los microorganismos del suelo, depende principalmente de la estructura química del fungicida y su dosis, así como del tipo de suelo (Hansda et al., 2014). Las bacterias representan el grupo taxonómico más abundante del suelo. Nuestros resultados mostraron un incremento en bacterias Gram-positivas a concentraciones recomendadas de fungicida y una disminución a dosis 10x, principalmente en suelos con bajo nivel de deterioro edáfico (L1 y L2). Similarmente, (Zhang et al., 2017), observaron incrementos bacterianos con la aplicación de las dosis recomendadas de fungicidas y pérdidas por la aplicación de dosis en exceso. Por otro lado, nuestros resultados mostraron aumento de bacterias Gram-negativas en suelos L1 y L2 con altas concentraciones del fungicida captan. En este sentido, la aplicación de captan pudo haber estimulado el incremento de biomasa bacteriana a través de su uso como fuente de carbono (Ullah et al., 2021). Megadi et al. (2010), observaron que *Bacillus circulans* degradó captan a través de una vía de oxidación (o-ftalato de protocatecuato) regida por enzimas específicas. Esta degradación permitió la generación de metabolitos intermediarios del captan que fueron utilizados como fuente de carbono e indujeron el crecimiento microbiano. Por otro lado, la aplicación de captan afectó negativamente la biomasa de los hongos, permitiendo el incremento de biomasa bacteriana consecuencia de la falta de competencia interespecífica con los hongos (Sułowicz y Piotrowska-Seget, 2016). Similarmente, Podio et al. (2008) reportaron que la aplicación de captan tanto a dosis recomendadas (1X) como a dosis diez veces más elevadas (10X) aumentó la molécula marcadora de biomasa Gram-negativa 18:1 $\omega$ 9c, principalmente en suelos con elevado contenido de MOS. El efecto de captan en los grupos bacterianos Gram-positivas y Gram-negativas del suelo pueden ser el resultado de varios factores. Por un lado, estos filos presentan diferentes habilidades para usar fuentes de C. Las bacterias Gram-negativas se alimentan solo de material fácilmente disponible, mientras que las bacterias Gram-positivas pueden usar C derivado de fuentes más complejas (Malik et al., 2015; Thoms et al., 2010). Por otro lado, la liberación de competencia de los grupos fúngicos podría generar cambios en la estructura de la comunidad bacteriana y estimular el crecimiento de grupos bacterianos específicos vinculados a cada manejo (El Azhari et al., 2018). Por lo tanto, se podría proponer que los cambios observados en la biomasa bacteriana no se deben únicamente a la exposición a fungicidas.

En nuestros resultados, las Actinobacterias mostraron los menores valores de biomasa en los tratamientos con dosis 10x en los tres manejos edáficos. Diversos autores informaron que la abundancia de Actinobacteria se correlacionó negativamente con fungicidas como Iprodione, 3,5-DCA y Thiabendazole, demostrando una elevada sensibilidad de este filo a altas concentraciones de pesticidas en el suelo (Papadopoulou et al., 2018; Vasileiadis et al., 2018). La aplicación de captan a dosis recomendada no presentó diferencias significativas con el control a excepción del suelo L2. Es ampliamente conocido que las Actinobacterias tienen una gran adaptabilidad al hábitat. En un estudio realizado por Malek et al. (2020), se encontró que aislados de *Streptomyces* podían crecer en presencia de fungicidas a dosis recomendada, entre ellos captan. En este sentido, nuestros resultados podrían indicar que ciertos grupos de bacterias en condiciones ambientales desfavorables, desarrollan mecanismos de adaptación y resistencia incrementando su biomasa (Baćmaga et al., 2018).

La aplicación de fungicidas modifica drásticamente la población de hongos del suelo, afectando a los ácidos nucleicos al inhibir la actividad del sistema de ARN polimerasa I, la mitosis y la división celular (Kalia y Gosal, 2011). Nuestros hallazgos están en línea con estudios previos que informaron la supresión directa del crecimiento de hongos en el suelo luego de la aplicación de fungicidas de amplio espectro como Iprodione (Verdenelli et al., 2012; Zhang et al., 2017), carbendazim (Wang et al., 2009; Yan et al., 2011), tebuconazol (Bending et al., 2007; Muñoz-Leoz et al., 2011) y azoxistrobina (Vuyyuru et al., 2018), entre otros. La reducción de la biomasa fúngica resultante de estos diversos compuestos sugiere que los hongos son más sensibles al estrés químico (Wu et al., 2014). Algunos autores reportaron inhibición de la respiración fúngica y efecto inhibitor del crecimiento en directa relación con la concentración del fungicida en el suelo (Yan et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados revelaron que los tratamientos con mayores dosis de captan disminuyeron significativamente la biomasa de hongos en relación con el tratamiento control. Por otro lado, nuestro estudio mostró que la biomasa fúngica fue significativamente mayor en suelos L1 en comparación con las observadas en suelos bajo manejo agrícola. Similarmente, Martínez-Toledo et al. (1998), observaron que las poblaciones de hongos en diferentes suelos de uso agrícola, se redujeron significativamente en presencia del fungicida captan. La inhibición fue más evidente a medida que aumentaba la concentración del fungicida. Esta tendencia es similar a las observadas en trabajos previos con el uso de

diferentes fungicidas (Brodie et al., 2003; Podio et al., 2008; Verdenelli et al., 2012). Los HMA participan en el aumento de los nutrientes de las plantas (P, N y micronutrientes), brindan protección contra los patógenos transmitidos por el suelo en la raíz y aumentan la absorción de agua (Covacevich y Echeverría, 2010). Al igual que lo observado con la biomasa fúngica, captan disminuye la biomasa de hongos micorrícicos arbusculares, principalmente en dosis más altas. Varios estudios informaron que los fungicidas tienen efectos directos sobre las poblaciones de hongos micorrícicos arbusculares (Chiocchio, 2000; Kalia y Gosal, 2011). De manera similar, Kurlle y Pflieger, (1996) catalogaron los efectos negativos de la aplicación de un gran número de fungicidas sobre la población de micorrizas arbusculares, la germinación de esporas y el crecimiento de hifas.

#### Quantificación de genes

La cuantificación de genes de ARNr puede usarse para determinar la abundancia de bacterias y hongos (Rousk et al., 2010). El menor número de copias. g<sup>-1</sup> del gen ARNr 16S en todos los tratamientos bajo dosis 10x de captan, indicó una supresión significativa de la población bacteriana a los 30 días de incubación con el fungicida. Resultados similares fueron reportados indicando que captan es un inhibidor relativamente potente, efectivo en bacterias incluso en concentraciones recomendadas (Pan et al., 2019; Rousk et al., 2009). Sin embargo, diversos autores indicaron que el efecto de los fungicidas sobre la abundancia bacteriana está relacionado con el tiempo de incubación, indicando que el efecto tóxico disminuye con el tiempo (El Azhari et al., 2018; Zhang et al., 2017). Coppola et al. (2011), evaluaron el impacto de diferentes mezclas de fungicidas habitualmente aplicados con una mezcla de compost en viñedos y mostraron una modificación evidente de las comunidades fúngicas y bacterianas después de la adición de fungicidas en el día 1. Sin embargo, al final del experimento no se observaron cambios significativos en la composición, mostrando la adaptación de las comunidades microbianas. Por otro lado, en los suelos bajo manejo agrícola, no se observaron diferencias significativas entre la dosis 1x y el control. Estos resultados podrían relacionarse en primer lugar, con la capacidad de algunos microorganismos de utilizar inhibidores como sustrato de crecimiento (Ingham, 1985; Megadi et al., 2010). En segundo lugar, los microorganismos muertos perderían la integridad de la estructura celular y se convertirían en nutrientes de los microorganismos resistentes (Pan et al., 2019). Por último, podrían relacionarse con la naturaleza del tipo de suelo y un historial de aplicación de agroquímicos, generando la presencia de bacterias resistentes a fungicidas.

Nuestros resultados demostraron que, en comparación con el tratamiento con 0x, las aplicaciones de captan redujeron notablemente la abundancia de la comunidad fúngica del suelo. Un estudio realizado por Zhang et al. (2017), reportó que la disminución fúngica podría relacionarse con la supresión de la síntesis de proteínas eucariotas y la posterior muerte celular, mecanismo de acción del captan (Pan et al., 2019). Resultados similares fueron reportados con la aplicación de otros fungicidas de amplio espectro (Pan et al., 2019; Sułowicz y Piotrowska-Seget, 2016; Verdenelli et al., 2012; Vuyuru et al., 2018; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2017). En general, la aplicación de fungicidas y quizás sus productos de degradación aumentan las ecotoxicidades sobre los organismos blanco en el suelo (Pan et al., 2019; Zhang et al., 2017). Sin embargo, en L1 y L2, la aplicación de captan 10x presentó mayor número de copias. g<sup>-1</sup> de 18S que la dosis 1x. Varios autores plantearon la hipótesis de que es posible que algunos fungicidas como captan aumenten el N del suelo al reducir las comunidades bacterianas responsables de capturar N y al proporcionar carbono digerible de la biomasa bacteriana, disminuyendo el impacto de las dosis tóxicas sobre los hongos en relación a las dosis recomendadas (Megadi et al., 2010; Ullah et al., 2021).

#### CONCLUSION

Nuestros resultados mostraron que, en general, el suelo L1 (con mayor contenido de MOS, y con menor degradación) presentó aumentos de actividad microbiana y de la abundancia de microorganismos. Estos resultados no fueron tan concluyentes en los suelos bajo manejo agrícola. En todos los manejos del suelo, la aplicación del fungicida captan en dosis superior a la recomendada, generó un fuerte impacto negativo en las actividades enzimáticas DHA y ureasa. La aplicación de captan 10x también provocó pérdidas en la abundancia de los taxones microbianos analizados, con excepción de bacterias Gram-negativas. Por otro lado, el efecto de la aplicación de dosis 1x no fue concluyente sobre las variables microbianas analizadas, su efecto estuvo principalmente influenciado por los diferentes niveles de degradación asociados al contenido de MOS. Los resultados obtenidos ayudan a comprender mejor los efectos del fungicida captan en las variables microbianas de suelos bajo diferentes manejos y diferentes contenidos de materia orgánica. Además, ilustran la importancia de seguir las recomendaciones de aplicabilidad de fungicidas, en particular captan, en función de manejo o uso del suelo, disminuyendo así los efectos negativos a largo plazo en las propiedades del suelo.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la investigación Científica y Tecnológica, (FONCyT: PICT 2019 n°2931) el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC).

## REFERENCIAS

- Abbott, C. P. y Beckerman, J. L. (2018). Incorporating adjuvants with captan to manage common apple diseases. *Plant Disease*, 102(1), 231–236. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0629-RE>
- Adam, G. y Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7–8), 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
- Baćmaga, M., Wyszowska, J. y Kucharski, J. (2018). The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes. *Ecotoxicology*, 27(9), 1188–1202. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1968-7>
- Baćmaga, M., Wyszowska, J. y Kucharski, J. (2019). The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 54(4), 252–262. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1553908>
- Bailey, G. W. y White, J. L. (1964). Soil-pesticide relationships: Review of Adsorption and Desorption of Organic Pesticides by Soil Colloids, with Implications Concerning Pesticide Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(4), 324–332. <https://doi.org/10.1021/jf60134a007>
- Bending, G. D., Rodríguez-Cruz, M. S. y Lincoln, S. D. (2007). Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere*, 69(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.042>
- Brodie, E., Edwards, S. y Clipson, N. (2003). Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00126-0)
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N. y Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Chen, S. K., Edwards, C. A. y Subler, S. (2001). A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Applied Soil Ecology*, 18(1), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00135-4)
- Chiocchio, V. (2000). Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology*, 3(3), 173–175.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M. y Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. In *Indian Journal of Microbiology* (Vol. 48, Issue 1, pp. 114–127). <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0011-8>
- Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Taccari, M., Ciani, M. y Vischetti, C. (2011). Fungicides degradation in an organic biomixture: Impact on microbial diversity. *New Biotechnology*, 29(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.005>
- Covacevich, F. y Echeverría, H. E. (2010). Indicadores para seleccionar inóculos de hongos micorrízicos arbusculares eficientes en suelos moderadamente ácidos. *Ciencia Del Suelo*, 28(1), 9–22.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z. y Kozdrój, J. (2010). Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.03.006>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, I., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2017). *Infostat - Software estadístico* (No. 2017). Grupo infoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Ding, H., Zheng, X., Zhang, J., Zhang, Y., Yu, J. y Chen, D. (2019). Influence of chlorothalonil and carbendazim fungicides on the transformation processes of urea nitrogen and related microbial populations in soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(30), 31133–31141. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06213-8>
- Dominchin, M. F., Verdenelli, R. A., Aoki, A. y Meriles, J. M. (2020). Soil microbiological and biochemical changes as a consequence of land management and water erosion in a semiarid environment. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(6), 763–777. <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1638915>
- Dominchin, M. F., Verdenelli, R. A., Berger, M. G., Aoki, A. y Meriles, J. M. (2021). Impact of N-fertilization and peanut shell biochar on soil microbial community structure and enzyme activities in a Typic Haplustoll under different management practices. *European Journal of Soil Biology*, 104, 103298. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103298>
- Dominchin, M. F., Verdenelli, R. A., Gil, S. V., Aoki, A., Marin, R. H. y Meriles, J. M. (2019). Effect of poultry biochar on chemical and microbiological properties in a typical haplustol soil under different land-use intensities. *Ciencia Del Suelo*, 37(2), 315–327.
- Ekmekyapar, F. y Deveci, M. (2008). Dissipation of captan in soil and tomato plants in field conditions. *Agrochimica*, 52(5), 273–284.



- El Azhari, N., Dermou, E., Barnard, R. L., Storck, V., Tournai, M., Beguet, J., Karas, P. A., Lucini, L., Rouard, N., Botteri, L., Ferrari, F., Trevisan, M., Karpouzias, D. G. y Martin-Laurent, F. (2018). The dissipation and microbial ecotoxicity of tebuconazole and its transformation products in soil under standard laboratory and simulated winter conditions. *Science of the Total Environment*, 637–638, 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.088>
- Epelde, L., Burges, A., Mijangos, I. y Garbisu, C. (2014). Microbial properties and attributes of ecological relevance for soil quality monitoring during a chemical stabilization field study. *Applied Soil Ecology*, 75, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.10.003>
- Fernandes, M. C., Cox, L., Hermosín, M. C. y Cornejo, J. (2006). Organic amendments affecting sorption, leaching and dissipation of fungicides in soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(12), 1207–1215. <https://doi.org/10.1002/ps.1303>
- Fierer, N. y Jackson, J. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117>
- Frasier, I., Noellemeyer, E., Figuerola, E., Erijman, L., Permingeat, H. y Quiroga, A. (2016). High quality residues from cover crops favor changes in microbial community and enhance C and N sequestration. *Global Ecology and Conservation*, 6, 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.009>
- Garbeva, P., Van Veen, J. A. y Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(29), 243–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- García, C., Hernández, T. y Costa, F. (1997). Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 28(1–2), 123–134. <https://doi.org/10.1080/00103629709369777>
- Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497–526. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520098>
- Gill Kaur, H. y Garg, H. (2014). Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In *Pesticides - Toxic Aspects* (pp. 187–230). <https://doi.org/10.5772/57399>
- Gu, L., Bai, Z., Jin, B., Hu, Q., Wang, H., Zhuang, G. y Zhang, H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostrobin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *Journal of Environmental Sciences*, 22(1), 134–141. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60084-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60084-X)
- Guo, P., Zhu, L., Wang, J. J., Wang, J. J., Xie, H. y Lv, D. (2015). Enzymatic activities and microbial biomass in black soil as affected by azoxystrobin. *Environmental Earth Sciences*, 74(2), 1353–1361. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4126-z>
- Hai, B., Diallo, N. H., Sall, S., Haesler, F., Schauss, K., Bonzi, M., Assigbetse, K., Chotte, J. L., Munch, J. C. y Schloter, M. (2009). Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 4993–5000. <https://doi.org/10.1128/AEM.02917-08>
- Hamed, S. M., Okla, M. K., Al-Saadi, L. S., Hozzein, W. N., Mohamed, H. S., Selim, S. y AbdElgawad, H. (2022). Evaluation of the phycoremediation potential of microalgae for captan removal: Comprehensive analysis on toxicity, detoxification and antioxidants modulation. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 128177. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128177>
- Hansda, A., Kumar, V. y Usmani, Z. (2014). Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective. *Recent Research in Science and Technology*, 6(1), 131–134. <http://recent-science.com/>
- Hashimi, M. H., Hashimi, R. y Ryan, Q. (2020). Toxic Effects of Pesticides on Humans, Plants, Animals, Pollinators and Beneficial Organisms. *Asian Plant Research Journal*, 5(4), 37–47. <https://doi.org/10.9734/aprj/2020/v5i430114>
- Howard, P. H. (2017). Handbook of environmental fate and exposure data: For organic chemicals, volume iii pesticides. In D. A. G. Philip H. Howard, Edward M. Michalenko, William F. Jarvis, Dipak K. Basu, Gloria W. Sage, William M. Meylan, Julie A. Beauman (Ed.), *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data: For Organic Chemicals, Volume III Pesticides* (e-book 201). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203719305>
- Ingham, E. R. (1985). Review of the effects of 12 selected biocides on target and non-target soil organisms. *Crop Protection*, 4(1), 3–32. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(85\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0261-2194(85)90002-X)
- Jiang, J., Yang, Y., Wang, L., Cao, S., Long, T. y Liu, R. (2022). Effects of Chlorothalonil Application on the Physio-Biochemical Properties and Microbial Community of a Yellow–Brown Loam Soil. *Agriculture (Switzerland)*, 12(5), 608. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050608>
- Kalia, A. y Gosal, S. K. (2011). Effect of pesticide application on soil microorganisms. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 57(6), 569–596. <https://doi.org/10.1080/03650341003787582>
- Kandeler, E. y Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Karpouzias, D. G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O. y Martin-Laurent, F. (2016). "LOVE TO HATE" pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Katsoula, A., Vasileiadis, S., Sapountzi, M. y Karpouzias, D. G. (2020). The response of soil and phyllosphere microbial communities to repeated application of the fungicide iprodione: Accelerated biodegradation or toxicity? *FEMS Microbiology Ecology*, 96(6), 56. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa056>

- Kurle, J. E. y Pflieger, F. L. (1996). Management influences on arbuscular mycorrhizal fungal species composition in a corn-soybean rotation. *Agronomy Journal*, 88(2), 155–161. <https://doi.org/10.2134/agronj1996.00021962008800020007x>
- Lambin, E. F. y Meyfroidt, P. (2010). Land use transitions: Socio-ecological feedback versus socio-economic change. *Land Use Policy*, 27(2), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2009.09.003>
- Liu, X. Z., Zhang, L. M., Prosser, J. I. y He, J. Z. (2009). Abundance and community structure of sulfate reducing prokaryotes in a paddy soil of southern China under different fertilization regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(4), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.01.001>
- Madejón, E., Murillo, J., Moreno, F., López, M., Arrue, J., Alvaro-Fuentes, J. y Cantero, C. (2009). Effect of long-term conservation tillage on soil biochemical properties in Mediterranean Spanish areas. *Soil and Tillage Research*, 105(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.still.2009.05.007>
- Maharjan, M., Sanaullah, M., Razavi, B. S. y Kuzyakov, Y. (2017). Effect of land use and management practices on microbial biomass and enzyme activities in subtropical top-and sub-soils. *Applied Soil Ecology*, 113, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.008>
- Malek, M., Ohno, T., Suzuki, H., Kitamura, H., Kuroda, K. y Shimizu, M. (2020). A novel strain of endophytic *Streptomyces* for the biocontrol of strawberry anthracnose caused by *Glomerella cingulata*. *Microbiological Research*, 234(November 2019), 126428. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126428>
- Malik, A. A., Dannert, H., Griffiths, R. I., Thomson, B. C. y Gleixner, G. (2015). Rhizosphere bacterial carbon turnover is higher in nucleic acids than membrane lipids: Implications for understanding soil carbon cycling. *Frontiers in Microbiology*, 6, 268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00268>
- Manlay, R. J., Feller, C. y Swift, M. J. (2007). Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems. In *Agriculture, Ecosystems and Environment* (Vol. 119, Issues 3–4, pp. 217–233). <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.07.011>
- Martínez-Toledo, M. V., Salmerón, V., Rodelas, B., Pozo, C. y González-López, J. (1998). Effects of the fungicide Captan on some functional groups of soil microflora. *Applied Soil Ecology*, 7(3), 245–255. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00026-7)
- May, L. A., Smiley, B. y Schmidt, M. G. (2001). Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9), 829–841. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-9-829>
- Medina, E. (2018). *Efectos de los diferentes manejos agronómicos sobre indicadores bioquímicos y microbiológicos de calidad de suelos de viñedos, San Juan, Argentina*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de San Juan. URL: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/83839/CONICET\\_Digital\\_Nro.39130da2-728d-4c8e-bcdc-aab52394acbc\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/83839/CONICET_Digital_Nro.39130da2-728d-4c8e-bcdc-aab52394acbc_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M. P., Yadav, G. S., Jhariya, M. K., Jangir, C. K., Pathan, S. I., Dokulilova, T., Pecina, V. y Marfo, T. D. (2020). Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. In *Land*, 9(2), 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>
- Megadi, V. B., Tallur, P. N., Mulla, S. I. y Ninnekar, H. Z. (2010). Bacterial degradation of fungicide captan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12863–12868. <https://doi.org/10.1021/jf1030339>
- Meriles, J. , Vargas Gil, S., Conforto, C., Figoni, G., Lovera, E., March, G. y Guzmán, C. (2009). Soil microbial communities under different soybean cropping systems: Characterization of microbial population dynamics, soil microbial activity, microbial biomass, and fatty acid profiles. *Soil and Tillage Research*, 103(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.still.2008.10.008>
- Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I. y Garbisu, C. (2011). Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2176–2183. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.001>
- Pal, R., Chakrabarti, K., Chakraborty, A. y Chowdhury, A. (2005). Pencycuron application to soils: Degradation and effect on microbiological parameters. *Chemosphere*, 60(11), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.068>
- Pan, Y., Wu, Y., Li, X., Zeng, J. y Lin, X. (2019). Continuing Impacts of Selective Inhibition on Bacterial and Fungal Communities in an Agricultural Soil. *Microbial Ecology*, 78(4), 927–935. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01364-0>
- Papadopoulou, E. S., Genitsaris, S., Omirou, M., Perruchon, C., Stamatopoulou, A., Ioannides, I. y Karpouzias, D. G. (2018). Bioaugmentation of thiabendazole-contaminated soils from a wastewater disposal site: Factors driving the efficacy of this strategy and the diversity of the indigenous soil bacterial community. *Environmental Pollution*, 233, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.021>
- Pérez-Brandán, C., Huidobro, J., Grümberg, B., Scandiani, M. M., Luque, A. G., Meriles, J. M. y Vargas-Gil, S. (2014). Soybean fungal soil-borne diseases: A parameter for measuring the effect of agricultural intensification on soil health. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(2), 73–84. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0792>
- Perucci, P. (1992). Enzyme activity and microbial biomass in a field soil amended with municipal refuse. *Biology and Fertility of Soils*, 14(1), 54–60. <https://doi.org/10.1007/BF00336303>
- Piotrowska-Seget, Z., Engel, R., Nowak, E. y Kozdrój, J. (2008). Successive soil treatment with captan or oxytetracycline affects non-target microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2843–2848. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9815-2>
- Podio, N. S., Guzmán, C. A. y Meriles, J. M. (2008). Microbial community structure in a silty clay loam soil after fumigation with three broad spectrum fungicides. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(4), 333–340. <https://doi.org/10.1080/03601230801941675>

- Prashar, P. y Shah, S. (2016). Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. In *Sustainable Agriculture Reviews* (19th ed., pp. 331–361). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_8)
- Rousk, J., Baath, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C. A., Caporaso, J. G., Knight, R., Fierer, N., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C. A., Caporaso, J. G., Knight, R. y Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Rousk, J., Brookes, P. C. y Bååth, E. (2009). Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1589–1596. <https://doi.org/10.1128/AEM.02775-08>
- Saha, A., Pipariya, A. y Bhaduri, D. (2016). Enzymatic activities and microbial biomass in peanut field soil as affected by the foliar application of tebuconazole. *Environmental Earth Sciences*, 75(7), 558. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-5116-x>
- Satapute, P., Kamble, M. V., Adhikari, S. S. y Jogaiah, S. (2019). Influence of triazole pesticides on tillage soil microbial populations and metabolic changes. *Science of the Total Environment*, 651, 2334–2344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.099>
- Satyavani, G., Chandrasehar, G., Varma, K. K., Goparaju, A., Ayyappan, S., Reddy, P. N. y Murthy, P. B. (2012). Toxicity Assessment of Expired Pesticides to Green Algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Scholarly Research Notices*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/247072>
- Scariot, F. J., Jahn, L., Delamare, A. P. L. y Echeverrigaray, S. (2017). Necrotic and apoptotic cell death induced by Captan on *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2325-3>
- Serri, D. L., Pérez-Brandan, C., Meriles, J. M., Salvaggiotti, F., Bacigaluppo, S., Malmantile, A. y Vargas-Gil, S. (2022). Development of a soil quality index for sequences with different levels of land occupation using soil chemical, physical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104621>
- Shao, H. y Zhang, Y. (2017). Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Spark, K. M. y Swift, R. S. (2002). Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Science of The Total Environment*, 298(1), 147–161. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00213-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00213-9)
- Stemmer, M. (2004). Multiple-substrate enzyme assays: A useful approach for profiling enzyme activity in soils?. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.11.004>
- Sułowicz, S. y Piotrowska-Seget, Z. (2016). Response of microbial communities from an apple orchard and grassland soils to the first-time application of the fungicide tetraconazole. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 193–201. <https://doi.org/10.1016/J.ECO-ENV.2015.10.025>
- Thoms, C., Gättinger, A., Jacob, M., Thomas, F. M. y Gleixner, G. (2010). Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1558–1565. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.030>
- Tortella, G. R., Mella-Herrera, R. A., Sousa, D. Z., Rubilar, O., Acuña, J. J., Briceño, G. y Diez, M. C. (2013). Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.059>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Cea, M., Rodríguez-Rodríguez, C., Seguel, A. y Parada, J. (2019). Sorption Parameters of Carbendazim and Iprodione in the Presence of Copper Nanoparticles in Two Different Soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(3), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00037-8>
- Ullah, M. R., Carrillo, Y. y Dijkstra, F. A. (2021). Biocides provide a source of carbon and nitrogen directly to surviving microbes and indirectly through a pulse in microbial necromass. *Applied Soil Ecology*, 160, 103862. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103862>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suci, N., Pappolla, R. A., Tourna, M., Karas, P. A., Papadimitriou, F., Kasiotakis, A., Ipsilanti, N., Ferrarini, A., Sulowicz, S., Fornasier, F., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Trevisan, M., Karpouzas, D. G., Sulowicz, S., Karpouzas, D. G. (2018). Blame It on the Metabolite: 3,5-Dichloroaniline Rather than the Parent Compound Is Responsible for the Decreasing Diversity and Function of Soil Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01536-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18>
- Vázquez, C., Verdenelli, R. A., Merlo, C., Pérez Brandan, C., Kowaljow, E. y Meriles, J. M. (2022). Influence of land-use changes on microbial community structure and diversity in a semiarid region. *Land Degradation and Development*. <https://doi.org/10.1002/ldr.4416>
- Verdenelli, R. A., Dominchin, M. F., Pérez-Brandan, C., Rovea, A., Vargas-Gil, S. y Meriles, J. M. (2019). Effect of long-term mineral fertilisation on soil microbial abundance, community structure and diversity in a Typic Hapludoll under intensive farming systems. *Annals of Applied Biology*, 175(3), 363–375. <https://doi.org/10.1111/aab.12546>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.066>
- Vergnoux, A., Guiliano, M., Di Rocco, R., Domeizel, M., Théraulaz, F. y Doumenq, P. (2011). Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research*, 111(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.03.005>
- Vuyyuru, M., Sandhu, H. S., Mccray, J. M. y Raid, R. N. (2018). Effects of Soil-Applied Fungicides on Sugarcane Root and Shoot Growth, Rhizosphere Microbial Communities, and Nutrient Uptake. *Agronomy*, 8(223), 1–17. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100223>
- Wang, F., Li, X., Zhu, L., Du, Z., Zhang, C., Wang, J. J., Wang, J. J. y Lv, D. (2018). Responses of soil microorganisms and enzymatic activities to azoxystrobin in cambisol. *Polish Journal of Environmental Studies*, 27(6), 2775–2784. <https://doi.org/10.15244/pjoes/81086>

- Wang, X., Lu, Z., Miller, H., Liu, J., Hou, Z., Liang, S., Zhao, X., Zhang, H. y Borch, T. (2020). Fungicide azoxystrobin induced changes on the soil microbiome. *Applied Soil Ecology*, 145, 103343. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.08.005>
- Wang, X., Song, M., Gao, C., Dong, B., Zhang, Q., Fang, H. y Yu, Y. (2009). Carbendazim induces a temporary change in soil bacterial community structure. *Journal of Environmental Sciences*, 21(12), 1679–1683. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62473-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62473-0)
- Wightwick, A. M., Reichman, S. M., Menzies, N. W. y Allinson, G. (2013). The Effects of Copper Hydroxide, Captan and Trifloxystrobin Fungicides on Soil Phosphomonoesterase and Urease Activity. *Water, Air, y Soil Pollution*, 224(12). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1703-1>
- Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X. y Zheng, Y. (2014). Responses of soil microbial community to different concentration of fomesafen. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.041>
- Yan, H., Wang, D., Dong, B., Tang, F., Wang, B., Fang, H. y Yu, Y. (2011). Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:Bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere*, 84(5), 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.038>
- Ye, X., Dong, F. y Lei, X. (2018). Microbial Resources and Ecology - Microbial Degradation of Pesticides. *Natural Resources Conservation and Research*, 1(1), 22–28. <https://doi.org/10.24294/nrcr.v1i1.242>
- Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J. y Sun, Y. (2019). Using enzyme activities and soil microbial diversity to understand the effects of fluoxastrobin on microorganisms in fluvo-aquic soil. *Science of the Total Environment*, 666, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.240>
- Zhang, M., Teng, Y., Zhang, Y., Ford, R. y Xu, Z. (2017). Effects of nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate and fungicide iprodione on soil fungal biomass and community: based on internal transcribed spacer region. *Journal of Soils and Sediments*, 17(4), 1021–1029. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1644-6>
- Zhang, M., Wang, W., Zhang, Y., Teng, Y. y Xu, Z. (2017). Effects of fungicide iprodione and nitrification inhibitor 3, 4-dimethylpyrazole phosphate on soil enzyme and bacterial properties. *Science of the Total Environment*, 599–600, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.011>