

**Evaluación de micetozoos como indicadores
ambientales en un contexto productivo
agrícola en Costa Rica.**

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería de Biosistemas

Proyecto final de graduación para optar por el grado de Licenciatura
en Ingeniería Agrícola

**Evaluación de micetozoos como indicadores
ambientales en un contexto productivo
agrícola en Costa Rica.**

Reiner Sibaja Matarrita

Sede Rodrigo Facio, Costa Rica


2017

Trabajo Final de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas,


Para optar por el grado de:

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGRÍCOLA

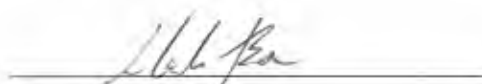
Tribunal Examinador




Ing. Giovanni Carmona Villalobos
Presidente, Tribunal Examinador.




Ph.D. Carlos Rojas
Director, Equipo Asesor



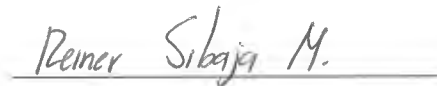
Lic. Leida Castro Barquero
Miembro, Equipo Asesor



Ph.D. Lidieth Uribe Lorío
Miembro, Equipo Asesor



Ing. Ronald Aguilar Álvarez
Miembro, Tribunal Examinador



Reiner Sibaja Matarrita
Sustentante

Agradecimientos y dedicatoria

El proyecto de graduación ha sido un proceso de mucho esfuerzo y apoyo, del cual agradezco a muchas personas por ayudarme en todo momento. Primero a mi familia al ser el soporte y la fuerza que me empujaba a trabajar en los momentos difíciles. A mis amistades y compañeros que me ofrecían su ayuda y conocimiento para ir avanzando con cada duda y problema que aparecía en el proceso.

Agradezco a los integrantes del laboratorio de Reforesta: Pedro, Randall y Karina que me ayudaron facilitándome los equipos, procedimientos y sus conocimientos ante las diversas dudas y tareas que me tocaban realizar, además de Steven por la ayuda en los muestreos y pruebas de laboratorio

. Agradezco al personal del Centro de Investigaciones agronómicas, Rebeca y Randall con sus conocimientos y toda la ayuda en la prueba de laboratorio más complicada que me toco realizar, también agradezco a Daniela del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por la ayuda brindada.

Agradezco particularmente a todo el personal del laboratorio de microbiología agrícola, los cuales me ayudaron en momentos difíciles con consejos y apoyo durante todo mi proyecto. Además agradezco a Luis Barboza de la escuela de matemática por la ayuda en la parte estadística.

Por ultimo agradezco a mi comité de tesis, quienes me guiaron durante el proceso, con sus observaciones, recomendaciones, consejos, comprensión y apoyo.

Prefacio

La presente investigación estudia un grupo de microorganismos poco estudiados en el ámbito agrícola. El uso de los micetozoos como un indicador ambiental es un tema interesante debido a sus posibles aplicaciones. Este grupo se considera como un grupo modelo de estudio para diversas áreas de investigación como medicina, pero nunca se ha considerado su potencial para ver si son sensibles a la gran variedad de actividades agrícolas en una zona tropical.

Las diversas actividades agrícolas tienen un impacto directo e indirecto en el comportamiento de las relaciones entre microorganismos y ambiente. Solo se pueden definir estos efectos tras una debida investigación.

El determinar si este grupo es sensible a las variables estudiadas en la presente investigación para cada ambiente establecido, es el objetivo de estudio y así determinar sus posibles alcances y limitaciones para la toma de decisiones en las diversas labores agrícolas.

Índice general

Índice de abreviaturas	VI
Índice de figuras	VI
Índice de cuadros	VII
Resumen	VIII
Objetivo general	1
Objetivo específico	1
CAPÍTULO 1. Contexto del proyecto	2
CAPITULO 2. ¿Pueden los micetozoos ser usados como indicadores de salud del suelo en el contexto agrícola de Costa Rica?.....	8
CAPÍTULO 3. Consideraciones de los resultados en el contexto agrícola.....	22
Referencias	29
Anexos	38

Índice de abreviaturas

CCA: Cultivo de caña de azúcar.

BCA: Bosque cercano a caña de azúcar

CP: Cultivo de piña

BP: Bosque cercano a cultivo de piña.

NDVI: Índice de vegetación de diferencia normalizada.

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de Costa Rica mostrando las regiones climáticas del país y la localización de los dos sitios de estudio en el contexto del presente trabajo. A. Sitio Jiménez, B. Sitio Zapote.	13
Figura 2. Incidencia porcentual de mixogástridos y dictiostélidos en los cuatro sistemas de estudio analizados en el presente estudio.	16
Figura 3. Comportamiento de las variables por ambiente para los dos primeros componentes en los mixogastridos	18
Figura 4. Comportamiento de las variables por ambiente para los dos primeros componentes en los dictiostélidos.	19
Figura 5. Distribución espacial del porcentaje de arcillas en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).	25
Figura 6. Distribución espacial del pH en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).	26
Figura 7. Distribución espacial de la respiración microbiana en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).	26

Índice de cuadros

Cuadro 1. Promedios de los valores obtenidos en cada prueba y su desviación estándar. 15	15
Cuadro 2. Variables seleccionadas para mixogastridos y dictiostélidos para cada tipo de regresión. 17	17
Cuadro 3. Resultados de los componentes principales para los mixogastridos y dictiostélidos. 17	17
Cuadro 4. Características edáficas de los suelos estudiados para cada ambiente. 23	23

Resumen

Las labores agrícolas para el mantenimiento de las condiciones idóneas de los diversos cultivos tienen un impacto en las características de un ambiente. El determinar si este impacto conlleva una disminución en las propiedades del suelo es complicado por lo que el uso de microorganismos sensibles a ciertas actividades, surge como un medio para corroborar la hipótesis planteada del uso de grupos particulares para este fin.

El uso de microorganismos como indicadores ambientales para diversas actividades es una opción viable que debe ser investigada. Los micetozoos son un grupo de microorganismos, los cuales no han sido estudiados en zonas tropicales. El estudio de estos es interesante, ya que se desconoce sus posibles alcances en temas de índole agrícola como la conservación de la diversidad microbiana de un suelo. Los micetozoos están conformados por dos grupos los mixogastridos y los dictiostélidos para esta investigación. Ambos fueron estudiados en iguales condiciones y bajo los mismos parámetros.

La presente investigación trata de responder las preguntas planteadas sobre la sensibilidad de este grupo a diversos parámetros, tanto a nivel de suelo evaluando propiedades como textura, retención de agua, biomasa microbiana entre otros, como a nivel espacial con NDVI y porcentaje de uso del suelo. Esto con el fin de tener un espectro más amplio de análisis de posibles interacciones entre variables.

La investigación se centró en dos cultivos en zonas diferentes, caña de azúcar en la zona de Jiménez de Cartago y piña en Sarapiquí de Heredia. Los muestreos se realizaron en época seca.

Los resultados muestran que en el caso particular de los mixogástridos las variables más importantes para su presencia fueron los niveles de manganeso, la respiración microbiana y el pH. Estas tres variables explicaron un 100% de la variabilidad en los datos con respecto al conjunto del set de datos. El manganeso se relaciona directamente con ambos cultivos, donde una disminución de este elemento se relaciona con una disminución de este grupo en específico.

Para los dictiostélidos se observó que los parámetros que explican el 99% de la variabilidad en estos, fueron el porcentaje de arcilla, el pH y la biomasa microbiana. Pero estos no presentan una relación directa con un ambiente en específico observando los resultados del análisis multivariable.

Formato del documento

El presente documento está dividido en tres capítulos, el primer capítulo es un contexto general del proyecto, el segundo capítulo es un artículo científico con su respectiva introducción, resultados y conclusiones, el último capítulo son consideraciones generales en una escala más amplia.

Objetivo general

Evaluar el potencial del grupo de los micetozoos como bioindicadores ambientales asociados a la actividad intensiva de cultivo de piña y caña.

Objetivo específico

- Evaluar la relación entre variables paisajísticas y de sitio sobre la dinámica de presencia de micetozoos.
- Determinar el efecto de la agricultura intensiva del cultivo de piña y caña en el grupo de los micetozoos.
- Comparar la estructura de los ensamblajes de especies de los micetozoos asociados con dos zonas geográficas con condiciones diferentes.

CAPÍTULO 1. Contexto del proyecto

El suelo es un ambiente complejo que contiene una alta diversidad microbiana. La estrecha conexión entre la presencia de microorganismos y las condiciones bioquímicas del suelo permite la existencia de biosistemas de todo tipo. Sin embargo, cualquier efecto negativo sobre esta dinámica entre los microorganismos y las acciones del hombre, tiene el potencial de afectar negativamente a otras variables que dependen del mismo. Es así que el estudio microbiológico de suelos permite generar información útil para ofrecer mejores alternativas de manejo del suelo y con ello potencialmente mejorar la eficiencia de cultivos.

La función de los microorganismos en el suelo es muy amplia debido a que ellos están relacionados principalmente con los ciclos de los nutrientes, la mineralización, la humificación, la formación de la estructura física, la degradación de los contaminantes y la fertilidad del suelo (1). Además, según los microorganismos presentes en el suelo, existen funciones sistémicas especializadas para el crecimiento del cultivo y producción (2). Es importante entender cómo las comunidades microbianas funcionan dentro del paisaje heterogéneo del suelo(3). Por lo tanto, entender procesos clave en las interacciones microbianas asociados a las plantas como sustentabilidad de la agricultura, restauración del ecosistema, biomasa entre otros es importante. (4).

La información generada por el estudio de las diversas poblaciones microbianas presentes en el suelo, representa una herramienta útil para ayudar en el manejo de las labores agrícolas. Lo anterior tiene base en el hecho de que la agricultura siempre tiene un impacto sobre las condiciones de suelo, por lo que tener indicadores que permitan reconocer este impacto, es de gran importancia.

El uso de indicadores de calidad del suelo es importante para guiar decisiones de manejo de tierras y recursos (5). Aunque hay muchas definiciones de indicadores, una de las más habituales es la que lo considera como una variable, que ha sido socialmente dotada de un significado añadido mayor al derivado de su propia configuración científica, con el fin de reflejar de forma sintética una preocupación social con respecto al medio ambiente e insertarla en el proceso de toma de decisiones(6).

Las actividades agrícolas como movimiento de suelos, uso de agroquímicos y exceso de equipos agrícolas, imponen un impacto directo sobre el suelo. El uso intensivo del suelo provoca una degradación de su capacidad productiva. Por ello es importante contar con información sobre la relación suelo-microorganismos-sistemas productivos que permita una mejor toma de decisiones sobre prácticas agrícolas.

Estas actividades conllevan un cambio en la estructura del biosistema de tal manera que la optimización de las propiedades del suelo pueda tener un efecto en la productividad del cultivo. Pero no solo el efecto del hombre influye en un cambio en las propiedades del suelo, tenemos que la erosión debido al viento y el agua, la compactación de suelo, la pérdida de materia orgánica, la capacidad de retención de agua y la actividad biológica (7) son variables que influyen en estos biosistemas. Las propiedades biológicas del suelo, debido a su alta sensibilidad y capacidad de reflejar los efectos de la gestión de actividades humanas se pueden utilizar como indicadores de calidad de suelo (8). Lo anterior debido a que estas afectan las poblaciones microbianas, biomasa y actividad microbiana, entre otros.

Los suelos saludables son esenciales para la integridad de los ecosistemas terrestres y la salud de estos dependen del resultado neto de procesos de conservación y degradación (9). Por lo tanto se propone que la salud del suelo depende del mantenimiento de cuatro funciones

principales: transformaciones de carbono, ciclos de nutrientes, mantenimiento de la estructura, la regulación de plagas y enfermedades(10).

Además es importante mencionar que las demandas de alimentos por parte de una creciente población humana aumentan la importancia y la urgencia de entender cómo Los microbiomas pueden ser explotados para aumentar los rendimientos de los cultivos.(11)

En el presente proyecto se ha seleccionado el grupo de microorganismos conocido como micetozoos debido a los resultados del proyecto 731-B5-058 de la Unidad de Recursos Forestales de la Facultad de Ingeniería. En la ejecución de ese proyecto que originalmente trataba sobre la determinación de un protocolo de aislamiento de mixogástridos a partir de suelos tropicales, se obtuvieron datos que indicaron que las zonas de bosque alrededor de los cultivos de piña son atípicamente ricas en estos microorganismos mientras que los cultivos contaban con una presencia baja de estos.

Esto llevó a los investigadores a plantear la idea de que los suelos de algunos cultivos comerciales, al estar siendo afectados por el manejo intensivo, presentarían niveles bajos de micetozoos, lo cual vincularía a estos microorganismos con el concepto de indicadores ambientales. Debido a que estos organismos han sido pobremente estudiados en el contexto de análisis de suelo, la presente investigación se planteó como una estrategia para aumentar el cuerpo de información sobre los mixogástridos y su potencial de aplicación. Estos organismos son protistas depredadores de bacterias y al consumirlas controlan su abundancia por lo que a su vez, modulan la capacidad fisiológica o el vigor de la población bacteriana (12).

Los micetozoos taxonómicamente pertenecen al dominio Eukarya (13) su reino es el Protista y el filo de los Amoebozoa (14). Estos comprenden tradicionalmente dos grupos de microorganismos filogenéticamente estables conocidos como mixogástridos y dictiostélidos (15).

El mayor esfuerzo de investigación se ha llevado a cabo con el primer grupo a pesar de que en zonas tropicales los dictiostélidos, al menos de forma general, son muy comunes. Es interesante que el potencial de aplicación de estos dos grupos como indicadores de cambio estructural en sistemas biológicos es todavía desconocido (16). Lo anterior responde parcialmente al escaso interés poco aplicado de la mayoría de los estudios con estos dos grupos de microorganismos en suelo (17). Los micetozoos se caracterizan por poseer cuerpos fructíferos microscópicos y estados vegetativos activos en todos los ecosistemas terrestres en el planeta (18). Este grupo es además el más diverso de los Amoebozoa o las amebas clásicas.

El ciclo de vida de estos organismos, abarca dos etapas tróficas muy diferentes, una que consiste en amebas uninucleadas con o sin flagelos, y otra que consiste en una estructura multinucleada conocida como el plasmodio, la etapa más visible. Durante la esporulación que se da tras la etapa plasmodial, se producen muchas esporas pequeñas que dan origen a células ameboflageladas. Lo anterior les confiere un poder de movilidad diferente al de las otras amebas y les permite sobrevivir en condiciones secas, hiper-húmedas y altamente variables (19). Algunos estudios además han confirmado que los mixogastridos son fáciles de detectar e identificar, por lo que pueden servir como indicadores útiles para evaluar la perturbación del suelo (20).

De esta forma, el desarrollo de esta investigación buscó encontrar la relación de los micetozoos con variables edáficas, microbiológicas y antropogénicas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de los micetozoos como indicadores ambientales, que permitan determinar diferencias entre las zonas de cultivo y los bosques circundantes. Actualmente existe la necesidad de búsqueda de indicadores biológicos que permitan la evaluación del impacto que ejercen las prácticas agronómicas sobre el ambiente (21). Lo anterior

dentro del marco de trabajo que define a estos indicadores como una propiedad o característica del proceso que puede ser medida para detectar cambios en un sistema de estudio. Los indicadores biológicos incluyen la cuantificación poblacional de micro y macro-organismos, así como de su actividad o subproductos.

En el contexto de Costa Rica, la piña y la caña son cultivos agrícolas de gran producción. La actividad se encuentra distribuida por casi toda Costa Rica con unas 43,000 hectáreas de piña. Tiene presencia en las Zonas Norte, Pacífico y Atlántica del país, con un 98% de la producción destinado a la exportación (22). En el caso de la caña se cuenta con 53,642 hectáreas cultivadas en promedio de los últimos años (23).

Debido a su demanda internacional, los ubica como cultivos de gran valor. La problemática de estos cultivos, en particular la piña, viene con el manejo de suelos y agroquímicos, los cuales van desgastando las condiciones del suelo. Asimismo, debido a que la agricultura intensiva toma mayor fuerza en cultivos de exportación.

En el caso del cultivo de piña, se requiere una labor intensiva del suelo para lograr condiciones idóneas de cultivo. El efecto de este trabajo tiene una relación directa sobre los microorganismos presentes en esta matriz edáfica, lo cual ocasiona que el suelo pierda sus características microbiológicas originales.

En Costa Rica, la piña se cultiva en suelos de los órdenes Alfisolos y Ultisolos. Estos suelos poseen, en términos agrícolas prácticos, una capa arable muy semejante (24). Sin embargo, frente al manejo intensivo, los ultisolos presentan los problemas nutricionales más acentuados. Si a lo anterior se le agregan diferencias del tipo microbiológico debidas al manejo del suelo antes y durante el cultivo, es posible que las características propias de la autofertilización sean dramáticamente diferentes a las de los mismos tipos de suelo en su

estado dinámico de equilibrio biosistémico. En el caso de la caña los suelos utilizados normalmente son del orden de los Vertisoles. Estos tienen una consistencia que afecta directamente las operaciones de labranza, en general los vertisoles son pegajosos y muy húmedos, cuando están secos son suelos muy duros (25).

En el caso de la presente investigación el orden de los suelos de ambos cultivos pertenece a los Inceptisoles. Estos suelos cuando son profundos y de pendiente suave son adecuados para su uso como tierras de cultivo. Estos se encuentran en tierras altas y en llanuras de inundación. Además son uno de los más importantes para cultivar casi cualquier tipo de vegetación, dependiendo de su textura, clima y humedad disponible (26).

Es primordial considerar todos los posibles efectos que pueden ocurrir en el suelo debido a las actividades agrícolas. El actual número de especies en un biosistema y su interacción depende del entorno físico y de los flujos de energía (27). Estos aspectos permiten el establecimiento de una relación multifactorial entre los microorganismos y el suelo, que a la vez definirán características deseadas para el favorecimiento del cultivo.

Una forma de llevar un control más adecuado sobre las labores agrícolas es la implementación de la agricultura de conservación. Este enfoque encaja dentro de los parámetros de trabajo de la ingeniería ambiental aplicada al ámbito de los biosistemas. Con esta se busca tener un mejor manejo de recursos teniendo como objetivo conservar, mejorar y hacer un uso más eficiente de los recursos naturales a través de una gestión integrada de los recursos (28).

CAPITULO 2. ¿Pueden los micetozoos ser usados como indicadores de salud del suelo en el contexto agrícola de Costa Rica?

Resumen: El estudio de micetozoos y su interacción con el suelo es un tema con escasa investigación a nivel mundial. Con el objeto de estudiar esta interacción, nosotros documentamos la incidencia de dos grupos de micetozoos en dos sistemas agrícolas de caña de azúcar y piña en Costa Rica. Para cada sistema de estudio cuantificamos una serie de variables edáficas, químicas y paisajísticas. Los resultados mostraron que, con respecto a controles naturales en bosques circundantes, los micetozoos no fueron negativamente afectados en sistemas de cultivo de caña de azúcar, pero si en sistemas de cultivo de piña. Lo anterior fue especialmente visible en el caso de la actividad de dictiostélidos. Tras el análisis, encontramos que el porcentaje de arcilla y la cantidad de manganeso en el suelo parecen ser los parámetros medidos de mayor importancia para explicar la incidencia de estos microorganismos. Los resultados anteriores señalan un posible potencial de uso de micetozoos como indicadores ambientales, en tanto el efecto de los sistemas de cultivo sobre la actividad de los microorganismos fue cuantificable. Sin embargo, consideramos que se requiere todavía definir el papel de las diferentes variables medidas sobre la dinámica de ambos grupos de microorganismos para poder establecer su potencial aplicación, apoyada por datos empíricos.

Palabras clave: biosistemas, caña de azúcar, dictiostélidos, mixomicetes, mixogástridos

1. Introducción

Las actividades agrícolas desencadenan cambios a múltiple escala en los biosistemas involucrados. Lo anterior puede afectar las propiedades del suelo y tener un efecto en la productividad del cultivo. La disminución de la productividad del suelo, entre otras cosas, se relaciona con la erosión debida por el viento y el agua, la compactación, la pérdida de materia orgánica, la capacidad de retención de agua y la actividad biológica (7). De forma interesante los microorganismos del suelo afectan fuertemente la productividad (29), En este sentido, si bien es cierto que se han estudiado muchos grupos de microorganismos en el suelo, los micetozoos no han sido fuertemente documentados (14)(30).

El impacto del uso de suelo sobre este grupo de microorganismos, uno de los más numerosos en sistemas edáficos todavía es un aspecto poco estudiado (20). El suelo es un ambiente complejo y sus condiciones bioquímicas y físicas modifican los patrones de actividad biológica (31). Es así que el estudio microbiológico de suelos, en particular con grupos de organismos poco documentados, incrementa la base de conocimiento integrado sobre ecología microbiana (32). Lo anterior puede permitir el diseño de alternativas más adecuadas para el manejo del suelo.

Los micetozoos comprenden tradicionalmente dos grupos de microorganismos filogenéticamente estables conocidos como mixogastridos y dictiostélidos (15). El mayor esfuerzo de investigación se ha llevado a cabo con el primer grupo a pesar de que en zonas tropicales los dictiostélidos, al menos de forma general, son muy comunes. Es interesante sin embargo, que se desconozca todavía el potencial de uso de estos dos grupos como indicadores de cambio en sistemas biológicos (33). Lo anterior responde al poco estudio con estos dos grupos de microorganismos (34).

La relación entre las especies y el biosistema dependen del entorno físico, la dinámica de transferencia de energía y los mecanismos de control de ésta última (27). Así, para poder comprender si cambios en un sistema tienen un efecto a nivel biológico, es necesario diseñar experimentos que permitan incrementar la cantidad de información disponible sobre estas relaciones. Por lo anterior, hemos diseñado la presente investigación con el objetivo de documentar, utilizando una estrategia multifactorial, las posibles diferencias en la incidencia de los dos grupos de mixogástridos entre 1) dos sistemas agrícolas y 2) entre cada sistema y el entorno boscoso circundante.

Nuestra idea detrás de este trabajo ha sido generar información base para definir el potencial que tienen los mixogástridos como indicadores ambientales relacionados con el uso y manejo de la tierra. Lo anterior no solo es relevante para definir posibles estrategias de manejo alternativo del suelo en los cultivos estudiados, sino para determinar líneas base de información que puedan ser utilizadas en un contexto de seguimiento temporal por efecto de fenómenos como cambio climático (35).

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en Costa Rica durante el periodo 2016-2017. Para ello, se seleccionaron dos zonas del país con disponibilidad de cultivos de caña de azúcar y piña en suelos clasificados como inceptisoles con predominancia de la textura arcillosa y dentro de la zona climática de bosque tropical lluvioso. En el caso de la piña, se eligió un sitio cercano a la comunidad de Atirro en el cantón de Jiménez mientras que para el cultivo de caña, se seleccionó un sitio cercano a la comunidad de Zapote en el cantón de Sarapiquí (Figura 1).

El sitio en el cantón de Jiménez presentó topografía plana en el área de cultivo y una ligera pendiente en el bosque (Figura 1A). El suelo de la zona presentó ligeros problemas de drenaje y para efectos de registro, consideramos que el sitio tiene aplicación moderada de químicos, normalmente utilizados para mejorar el rendimiento y evitar problemas de crecimiento y de plagas. Registramos además la mecanización del suelo como moderada y el espaciamiento entre plantas fue de 1 m aproximadamente, con pequeños canales de drenaje. Por su parte, el sitio en el cantón de Sarapiquí, presentó la misma topografía en las zonas de cultivo y de bosque que el sitio anterior (Figura 1B). Sin embargo, los canales de drenaje fueron de aproximadamente un metro de profundidad y el suelo presentó una fuerte mecanización. En este sitio, documentamos el uso de agroquímicos como alto, debido a la necesidad agroindustrial de controlar plagas y mejorar condiciones de crecimiento de la piña.

Se determinó la selección del sitio de muestreo por la presencia de un bosque aledaño a la plantación respectiva. Cada sitio de recolección de muestras estuvo restringido a un área aproximada de una hectárea con una distancia de 100 m del borde hacia cada ambiente. El muestreo se realizó por las mismas fechas, pero los cultivos se encontraban en estado de crecimiento diferente, en el caso de la caña de azúcar estaba entre periodos productivos, mientras que el de piña se encontraba al final del mismo.

En cada sitio se seleccionaron 50 puntos de muestreo al azar. La mitad de los puntos se ubicaron dentro de la zona del cultivo y el resto se seleccionaron dentro del bosque para un total de 200 muestras de suelo recolectadas en el estudio completo. Así, los cuatro sistemas de estudio fueron 1) cultivo de caña de azúcar CCA, 2) bosque cercano a caña de azúcar (BCA), 3) cultivo de piña (CP) y bosque cercano a cultivo de piña (BP). Cada punto de muestreo fue

georreferenciado y el tamaño de muestra recolectado para realizar las pruebas de laboratorio fue de aproximadamente 350 g de suelo en todos los casos.

Las pruebas consistieron en análisis químicos, físico-estructurales y biológicos. Dentro de los primeros, se midió el contenido P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B, S con la metodología de Díaz y Hunter (36), la biomasa microbiana se determinó con la metodología de Vance (37) y la respiración del suelo siguiendo la metodología de Jenkinson y Powlson (38), el pH con el método de Henríquez (39). Como parámetros físico-estructurales, se determinó el grado de retención de agua y la textura del suelo (40). Finalmente, para determinar la incidencia de micetozoos se utilizó el protocolo estándar de aislamiento de micetozoos (41), con la siguiente modificación con platos de petri con dos secciones, cada una con una bacteria diferente, *Escherichia coli* en una sección del plato y *Bacillus subtilis* en la otra, además se hizo una dilución 1:10 y de añadir hojas doblemente autoclavadas, como cebo de crecimiento para mixogástridos. con el cual se registraron como positivos los aislamientos con alguna actividad de plasmodios de mixogástridos y esporóforos de dictiostélidos. El número de muestras analizado fue de 16 escogidas al azar para todas las pruebas con excepción del protocolo de Cavender donde se le hizo a todas las muestras.

Además de lo anterior, para cada sistema de estudio se obtuvieron imágenes Landsat 8 del 3 de abril y el 16 de junio del 2016. Estas imágenes se procesaron utilizando ArcMap 10.2 y se obtuvieron los valores del Índice Normalizado de Diferencia de Vegetación (NDVI). Con las mismas imágenes se realizó una caracterización rápida del uso de la tierra en un área correspondiente a 2.6 kilómetros cuadrados alrededor de los sitios de muestreo. De esta forma logramos determinar los porcentajes de bosque, ríos o cuerpos de agua, zonas agrícolas y

edificios en las zonas de estudio. Esta información adicional la utilizamos para evaluar el efecto de variables de paisaje sobre los resultados registrados de los dos grupos de micetozoos.

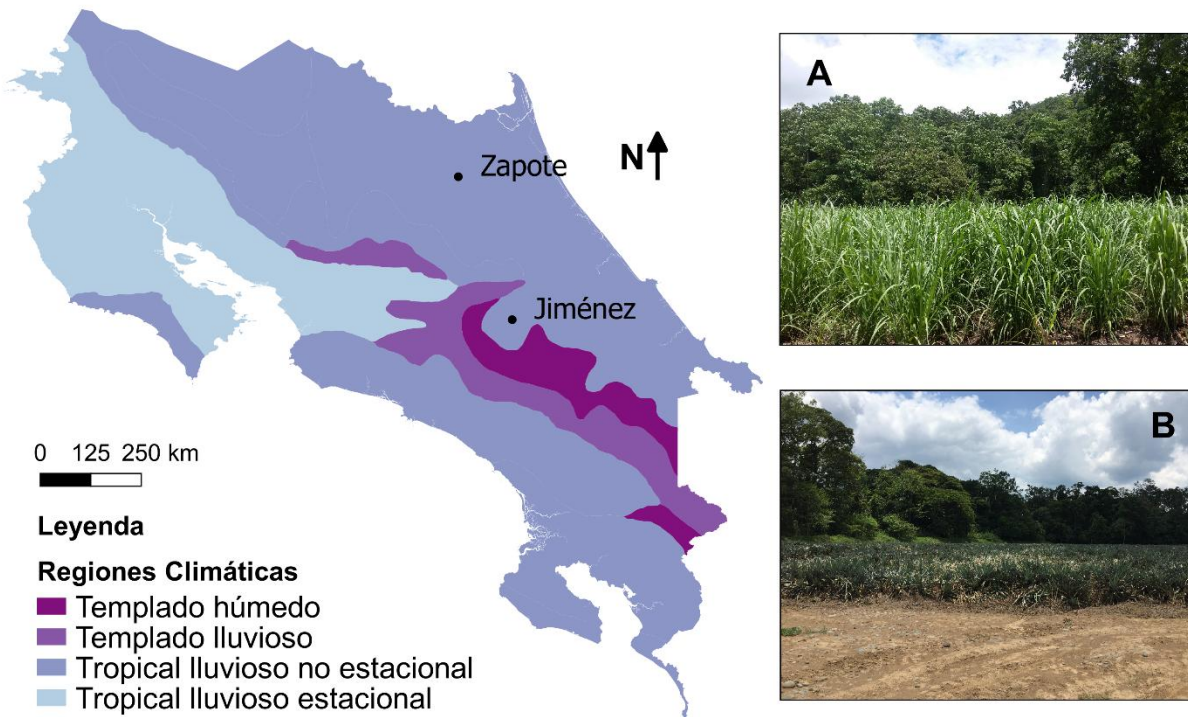


Figura 1. Mapa de Costa Rica mostrando las regiones climáticas del país y la localización de los dos sitios de estudio en el contexto del presente trabajo. A. Sitio Jiménez, B. Sitio Zapote.

Los datos se analizaron empleando estadística simple y pruebas de hipótesis con un valor de rechazo de la hipótesis nula de 0.05 y utilizando el número de registros de ambos grupos de micetozoos, por separado, como variable de respuesta. Para evaluar el peso de las diferentes variables sobre la distribución de los datos, se usaron regresiones múltiples y de Lasso (42)(43). Posteriormente se agruparon las variables seleccionadas en ambos análisis en un nuevo conjunto

de datos que fueron analizados con la técnica de componentes principales (PCA). Todo el análisis se llevó a cabo con el programa RStudio Versión 1.0.136.

3. Resultados

Se encontró que ambos grupos de micetozoos están presentes, en los cuatro sistemas de estudio analizados. Con excepción de CP, todos los sistemas estudiados mostraron valores más altos de incidencia de dictiostélidos que de mixogástridos. A pesar de lo anterior, fue precisamente CP, el que mostró los valores generales de incidencia más bajos de los cuatro sistemas estudiados (Figura 2). El CP fue, asimismo, el sistema de estudio con los valores más bajos de pH, respiración microbiana, calcio y manganeso (ver Cuadro 1).

Los valores más altos de hierro, fosforo, magnesio y potasio se encuentran en CP, de igual forma en este ambiente es donde encontramos la menor cantidad de micetozoos, esto se puede deber al uso intensivo de fertilizantes y agroquímicos los cuales reducen la diversidad microbiana del suelo y afecta la calidad del mismo (44). Interesantemente el valor más bajo de manganeso para los cuatros ambientes fue en la zona de cultivo de piña.

Los valores de NDVI dieron valores más altos en ambas zonas boscosas en comparación de sus cultivos respectivamente. Este resultados nos dice que las plantas presentes en bosque se encuentra en un mejor estado, ya que el NDVI toma de los pixeles de una imagen información sobre suelo y vegetación, dando resultados de la vitalidad utilizando las longitudes de onda del rojo y del infrarrojo cercano (45).

Cuadro 1. Promedios de los valores obtenidos en cada prueba y su desviación estándar..

VARIABLES	CCA	BCA	CP	BP
Porcentaje de arena	36.28 (6.53)	39.14 (6.67)	42.89 (6.15)	45.27 (6.33)
Porcentaje de limo	15.29 (3.31)	14.00 (3.18)	17.00 (3.56)	19.00 (2.82)
Porcentaje de arcilla	48.43 (6.09)	46.86 (6.34)	39.68 (5.85)	36.20 (5.83)
RA ¹ (mL agua/g suelo)	1.20 (0.11)	1.28 (0.16)	1.34 (0.15)	1.33 (0.10)
pH	5.33 (0.20)	4.98 (0.20)	4.84 (0.10)	5.81 (0.10)
BM ¹ (mg C/kg suelo)	49.4 (17.0)	122.6 (44.0)	56.0 (29.0)	35.2 (16.0)
RM ¹ CO ₂ -C (mg/g día)	0.20 (0.10)	0.36 (0.16)	0.14 (0.04)	0.26 (0.11)
Calcio (cmol(+)/L)	17.59	13.33	7.49	11.47
Manganeso (cmol(+)/L)	4.70	3.17	2.53	3.59
Potasio (cmol(+)/L)	0.29	0.29	0.77	0.54
Fósforo (mg/L)	4.00	8.00	28.00	17.00
Zinc (mg/L)	1.90	4.40	1.80	2.10
Cobre (mg/L)	10.00	14.00	9.00	9.00
Hierro (mg/L)	105.00	163.00	240.00	182.00
Magnesio (mg/L)	49.00	56.00	64.00	10.00
NDVI 3 abril	0.22 (0.05)	0.51 (0.03)	0.29 (0.04)	0.48 (0.09)
NDVI 16 jun	0.26 (0.06)	0.42 (0.02)	0.36 (0.04)	0.53 (0.09)
Porcentaje de bosque	44.62	44.62	16.21	16.21
Porcentaje de río	2.05	2.05	0.00	0.00
Porcentaje de zona agrícola	52.90	52.90	82.96	82.96
Porcentaje de edificios	0.43	0.43	0.82	0.82
Incidencia de mixogástridos	24%	10%	18%	6%
Incidencia de dictiostélidos	84%	38%	10%	60%
Incidencia de micetozoos	54%	43%	14%	33%

¹ RA= retención de agua, BM=biomasa microbiana, RM=respiración microbiana, NDVI Valores entre paréntesis son la desviación estándar.

Por su parte, la cuantificación de biomasa microbiana mostró como resultado, valores diferentes para cada sistema, lo cual se esperaba ya que esta variable es sensible a pequeños cambios en el suelo.

parámetros como la profundidad del muestreo, la presencia de materia orgánica o la época del año del muestreo provocaran variaciones en este parámetro (46). De forma interesante, el valor más alto estuvo asociado con el sistema BCA, el cual indicó valores de incidencia de

micetozoos en niveles intermedios. En el caso de la respiración microbiana, los valores más altos asociados con BCA y BP tienen sentido y parecen reflejar una mayor actividad microbiana en los bosques. Aun así, es interesante observar que este parámetro fue más bajo en CP que en CCA.

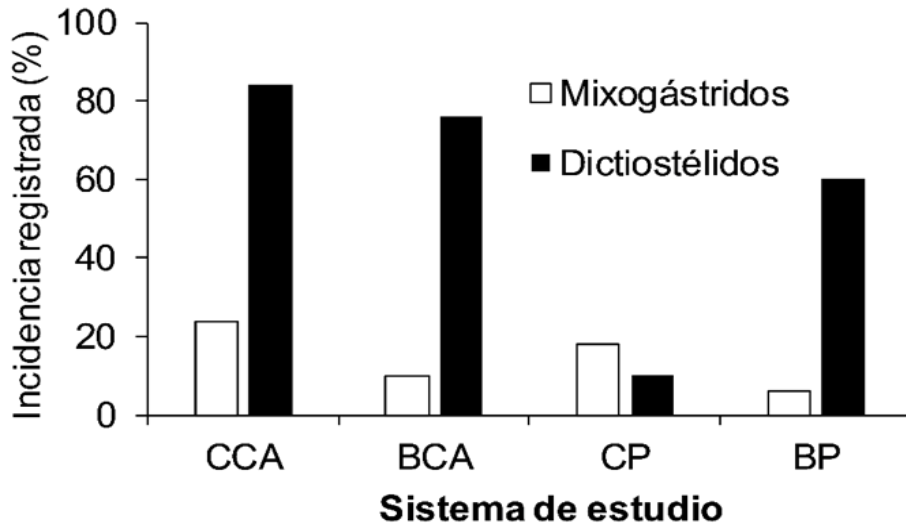


Figura 2. Incidencia porcentual de mixogástridos y dictiostélidos en los cuatro sistemas de estudio analizados en el presente estudio.

La selección de variables para llevar a cabo los componentes principales, se realizó por medio de la regresión de Lasso para las variables químicas, en este caso este método estadístico selecciona por sí solo las variables con mayor peso (ver Cuadro 2). La regresión múltiple se utilizó para el resto de variables, donde la selección se realizó con el criterio de selección de Akaike (Ver Cuadro 2) el cual es el más utilizado para estudios ecológicos.

Cuadro 2. Variables seleccionadas para mixogastridos y dictiostélidos para cada tipo de regresión.

Regresión múltiple		Regresión de Lasso	
Mixogastridos	Dictiostélidos	Mixogastridos	Dictiostélidos
%Limo	%Arcilla	Mn	K
%Arcilla	Retención de agua	----	P
pH	pH	----	Mn
Biomasa Microbiana	Biomasa Microbiana	----	----
Respiración Microbiana	----	----	----
NDVI1	----	----	----
NDVI2	----	----	----

Las variables seleccionadas se agruparon para realizar los componentes principales (ver Cuadro 3), donde el análisis de PCA da como resultado que en los mixogástridos los niveles de manganeso, respiración microbiana y pH fueron los tres componentes más importantes. Estas tres variables explicaron un 99% de la variación de presencia de mixogastridos. De forma similar, para el caso de los dictiostélidos, las tres variables más importantes fueron el porcentaje de arcillas, el pH y la biomasa microbiana, al explicar alrededor de un 99% de la variación de presencia de dictiostélidos.

Cuadro 3. Resultados de los componentes principales para los mixogastridos y dictiostélidos.

Componentes principales	Mixogastridos		Dictiostélidos	
	% Varianza	Variable	% Varianza	Variable
1	51.81	Mn	55.57	%Arcilla
2	35.36	Respiración Microbiana	34.49	pH
3	12.83	pH	9.931	Biomasa Microbiana

Los resultados de los componentes principales para ambos grupos, se graficaron para los dos primeros componentes, ver figura 3 y 4. Donde en el caso de los mixogastridos la única variable que se relacionó con ambos cultivos fue el manganeso. Esto no está mostrando una

sensibilidad hacia este nutriente en específico. Esto puede ser debido a uso de agroquímicos o plaguicidas para controlar los parámetros que afectan al cultivo.

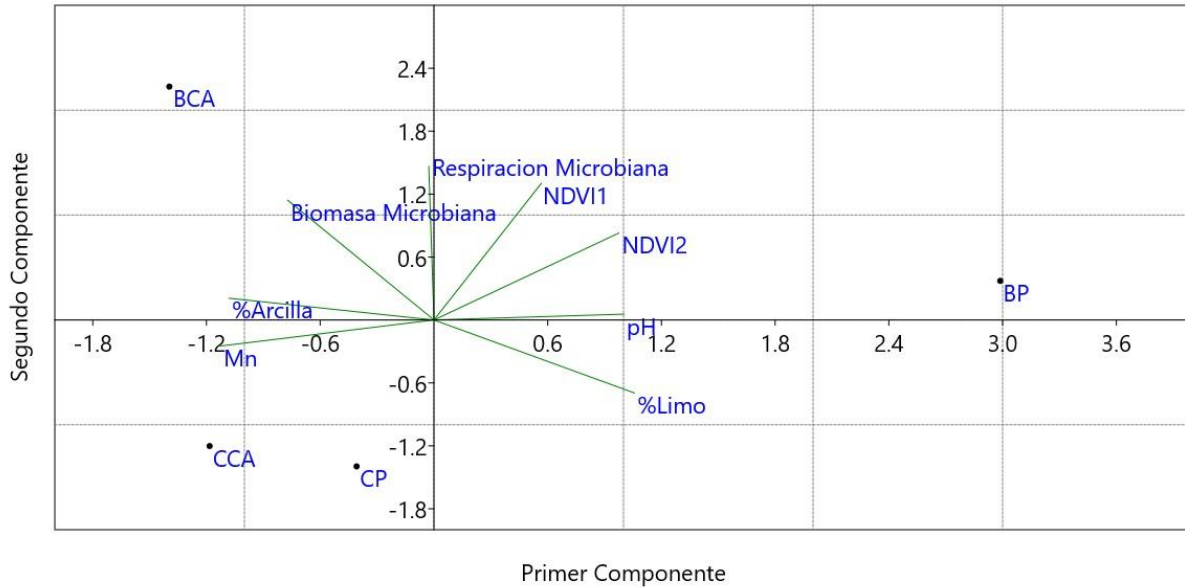


Figura 3. Comportamiento de las variables por ambiente para los dos primeros componentes en los mixogastridos

En el caso de los dictiostélidos no se observó que ninguna parametro estudiada este relacionada con ambos cultivos. Lo que si se encontró fue que variables químicas como potasio y fosforo tienen una relación con el cultivo de piña, confirmando el resultado de la regresión de Lasso donde el modelo seleccionado consideraba ambas variables. Esto ratifica una sensibilidad en particular de los dictiostélidos a estos nutrientes, tomando en cuenta que de momento se desconoce cuáles son las cantidades exactas que afectan a este grupo en particular.

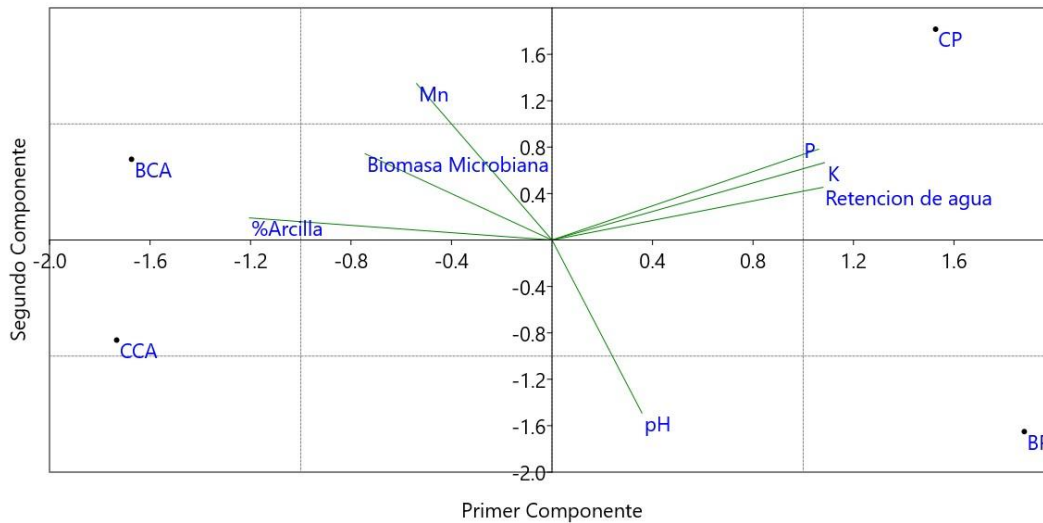


Figura 4. Comportamiento de las variables por ambiente para los dos primeros componentes en los dictiostélidos.

4. Discusión

Se registraron micetozoos en todos los sistemas de estudio, con un índice de presencia de las 100 muestras de 54 en CCA, 43 en BCA, 14 en CP y 33 en BP, lo cual indica que, como conglomerados de especies, estos dos grupos de organismos están bien representados en suelos de zonas tropicales. En este estudio, al evaluar únicamente actividad biológica a partir de estructuras vegetativas, no pudimos determinar la identificación de las especies, que a este nivel puede únicamente ser llevado a cabo a partir de técnicas moleculares (47). Sin embargo, consideramos que el presente esfuerzo representa un aporte considerable para comprender la dinámica de los dos grupos de microorganismos estudiados en sistemas con cultivos diferentes, que, en el contexto tropical ha dado como resultado la generación de datos no antes comunicados. La presencia de micetozoos fue más predominante en el ambiente de caña que en piña probablemente debido a las diferentes actividades agrícolas realizadas.

En la presente investigación se logró determinar que el suelo de todos los sistemas de estudio mostró un pH bajo. Sin embargo, los valores registrados se encontraron dentro del rango en el que los micetozoos sobreviven (48) aun así la variación de pH puede conducir a una reducción de microorganismos (44) , lo que concuerda con el hallazgo de que se encontraron estos organismos en todos los sistemas estudiados. La relación del pH con la estructura de la comunidad microbiana del suelo es resultado de la tolerancia de los microorganismos a un valor específico externo ya que las células deben mantener el pH de su citoplasma casi neutro (49). De acuerdo con los resultados y para el contexto de este trabajo, el pH individualmente no fue un buen indicador de presencia/ausencia de micetozoos, en particular de dictiostélidos que mostraron valores de incidencia altos para casi todos los sistemas de estudio.

De forma diferente, la potencial implicación de que la biomasa microbiana fuera variable con resultados tan diversos entre los sistemas estudiados se puede deber a múltiples factores como el tipo suelo entre otros. De esta forma, el bosque representaría un biosistema de refugio debido a las actividades agrícolas, provocando una emigración de los micetozoos a estas zonas. Si bien es cierto que la anterior observación tiene un alto grado de especulación, al mismo tiempo plantea una hipótesis de trabajo para estudios a futuro que no puede ser respondida todavía. En experimentos paralelos todavía no publicados, el tercer autor de este trabajo encontró que cuando se estudiaron 12 biosistemas con características paisajísticas diferentes en todo el territorio de Costa Rica, los que mostraron los valores más altos de incidencia fueron precisamente los parches de bosque asociados a monocultivos.

Con respecto a los resultados de respiración microbiana, es interesante tomar en cuenta que se ha documentado que una alta adición de nitrógeno por vía antropogénica aumenta este parámetro (50). Lo anterior no es sorprendente debido al efecto de otros factores, pero dentro del

contexto de cambio climático y seguimiento a través del tiempo, los valores que reportamos en este estudio representan un importante insumo de análisis. De forma similar, como se ha visto en otros trabajos, pequeñas variaciones en la temperatura del suelo pueden ser determinantes en modificar la estructura de los microorganismos presentes en un sitio (51). Por tanto, a pesar de que es intuitivo pensar que la respiración microbiana debe ser mayor en bosques que en sistemas de cultivo, como ha sido registrado en este trabajo, es importante observar que el valor más bajo asociado con CP quizás sugiere que este sistema es menos resiliente que CCA.

Los resultados de los análisis de PCA son importantes en el contexto de salud de suelo, ya que como ha sido establecido por otros autores, únicamente con una estrategia multiescala y multivariada como la utilizada en el presente estudio, se puede determinar el efecto de un biosistema edáfico sobre un grupo de organismos (52). Lo anterior se basa en el principio de que una alta diversidad de formas biológicas tiende a ser un excelente indicador de salud del suelo, especialmente en el contexto agrícola moderno y debería de promoverse su estudio, como lo refleja la presente investigación (53). En todo caso, debido a que el nivel de manganeso en el suelo fue la variable estudiada que mejor explicó la variabilidad de los datos, la presente investigación ha generado como resultado colateral la necesidad de enfocarse en esta variable en futuros estudios. Pareciera, por lo que hemos observado en el presente trabajo, que el manganeso tiene el potencial de aportar una clave más para comprender la relación dinámica entre micetozoos y el suelo.

CAPÍTULO 3. Consideraciones de los resultados en el contexto agrícola.

El uso de microorganismos como indicadores ambientales sirve como una herramienta sencilla, la cual tiene el poder de guía para la toma de decisiones que mejoren las condiciones del suelo y la productividad del mismo. La presente investigación buscó evaluar una herramienta nueva para determinar los posibles efectos de agricultura intensiva sobre un grupo específico de microorganismos.

Los sistemas de labranza afectan el ambiente fisicoquímico donde viven los organismos de suelo. Estas prácticas modifican el contenido de agua en el suelo, la temperatura, la aireación y el grado de mezcla de los residuos. Estos cambios en el entorno físico a su vez afectan el suministro de alimentos de los diversos organismos (54).

Los sistemas agrícolas dependen de la capacidad natural del suelo para generar y mantener una estructura favorable que permita tener una relación planta-nutrientes en cantidades adecuadas. En este sentido, el papel de la biota para favorecer ese proceso y a su vez prevenir plagas y enfermedades es importante (55).

Los sistemas agrícolas convencionales varían de finca a otra. Sin embargo comparten muchas características en común como la innovación tecnológica, su carácter de monocultivos con ciclos de cosecha amplios y el uso extensivo de plaguicidas o fertilizantes, entre otros (56). Estos estándares se buscan cambiar, dando un enfoque más ecológico y un manejo más sostenible de los recursos. En este contexto, la agricultura de conservación se ha propuesto como un conjunto ampliamente adaptado de principios que pueden asegurar una producción agrícola más sostenible (57).

De forma similar, la influencia antropogénica puede afectar el funcionamiento y la diversidad de los ecosistemas. Algunas perturbaciones ocurren debido a la erosión del suelo causada por efecto humano externo, lo cual puede disminuir progresivamente la estabilidad biológica, química y física de los ecosistemas (58).

Las dos zonas de estudio utilizadas en este trabajo presentaron suelos primordialmente arcillosos. (Cuadro 1). En los cuatro ambientes estudiados se presentaron condiciones similares. El orden de los suelos estudiados se encuentra dentro de la categoría de inceptisoles con un suborden de Udepts.

Cuadro 4. Características edáficas de los suelos estudiados para cada ambiente.

Ambiente	Orden	Tipo de suelo	Clasificación
CCA	Inceptisoles	Pesado	Arcilla
BCA	Inceptisoles	Pesado	Arcilla
CP	Inceptisoles	Medio	Migajón arcilloso
BP	Inceptisoles	Medio	Migajón arcilloso

Los suelos del suborden de los Udepts son suelos en formación donde al existir pendientes fuertes, presentan problemas de erosión. Estos suelos están normalmente asociados con la vegetación boscosa nativa para las zonas geográficas correspondientes (59). En el caso de la presente investigación, los suelos de ambas zonas de estudio son agrícolas, por lo que se asume que se ha dado un cambio en la vegetación original de las áreas correspondientes. Lo anterior a su vez, ha facilitado un cambio en la dinámica de los microorganismos del suelo presentes en las zonas estudiadas, debido a los cambios acumulados a lo largo de los años.

Los mixogastridos y dictiostélidos estudiados presentaron una distribución variada en las zonas de estudio. Estos grupos de microorganismos, al igual que otros presentes en el suelo,

desempeñan papeles esenciales en los procesos edáficos (60). Tras el experimento, se pudieron registrar efectivamente ambos grupos de micetozoos en los cuatro sistemas de estudio analizados. En la mayoría de estos sistemas, los valores más altos de incidencia correspondieron a dictiostélidos y los menores a mixogástridos. La única excepción se dio en el caso de la plantación de piña, donde se vio invertido ese patrón.

Si bien, es necesario ahondar en los detalles sobre esa relación encontrada, es posible que el manejo del cultivo de piña pueda ser la causante del cambio en la presencia de los dictiostélidos en suelo. El definir si esta es la razón detrás de las diferencias requiere una investigación a otros niveles, pero con los resultados obtenidos en este trabajo se observa una tendencia en esa dirección.

El análisis de los datos permitió conocer cuales parámetros estudiados tienen una mayor relación con los mixogastridos y dictiostélidos para los cuatro ambientes estudiados. Lo anterior es importante para determinar la dirección de estudios posteriores en la línea del uso de micetozoos como indicadores ambientales.

Las variables que explican en su mayoría la variabilidad de los datos son, por si solas, indicadores de continuidad de la investigación con estos microorganismos. Sin embargo, se debe considerar que el conjunto de parámetros son los que definen el comportamiento final, como ha sido observado en este trabajo. Lo cual permite recomendar una ampliación de la investigación hacia el estudio de otras variables y su relación sobre este grupo de microorganismos. En este sentido, un análisis de otros parámetros climáticos o espaciales permitiría observar con mejor detalle si este grupo de microorganismos se puede utilizar como un indicador en el contexto estudiado en este trabajo.

Por ejemplo, al hacer un análisis espacial de la distribución de valores asociados a las variables para las dos zonas de estudio, se puede observar que lo mencionado podría ser relevante. Tanto en el caso de la distribución del porcentaje de arcillas (Figura 3) como del pH (Figura 4), se observa que la cercanía al parche boscoso tiene un efecto sobre ambas. De hecho en el caso de la respiración microbiana (Figura 5) se observan valores más altos en puntos más cercanos al bosque.

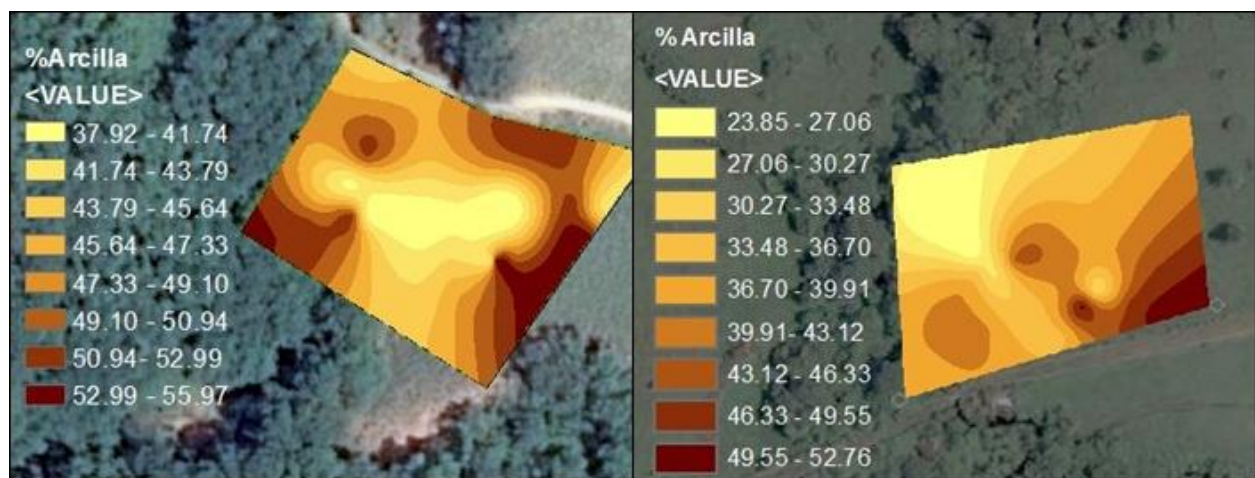


Figura 5. Distribución espacial del porcentaje de arcillas en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).

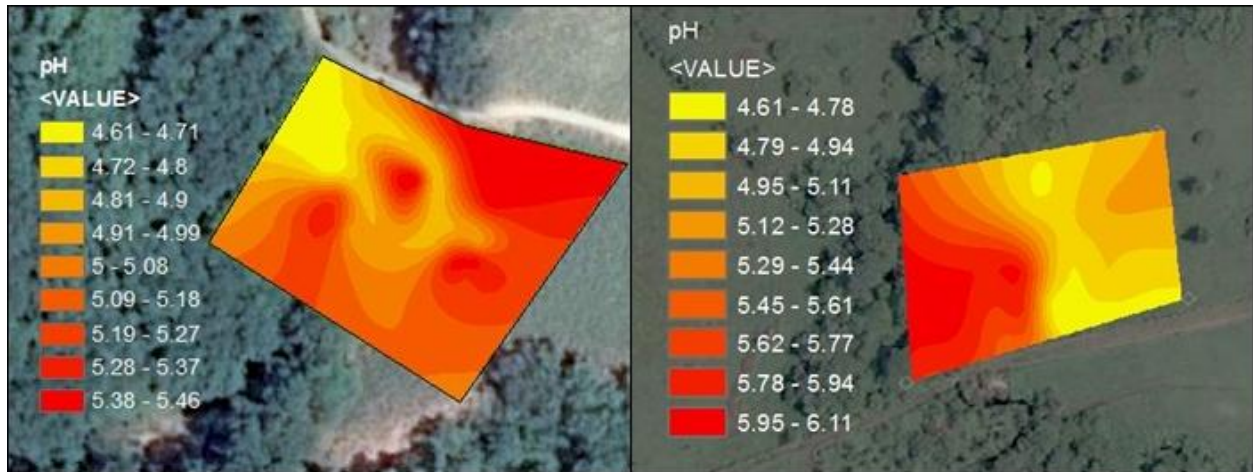


Figura 6. Distribución espacial del pH en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).

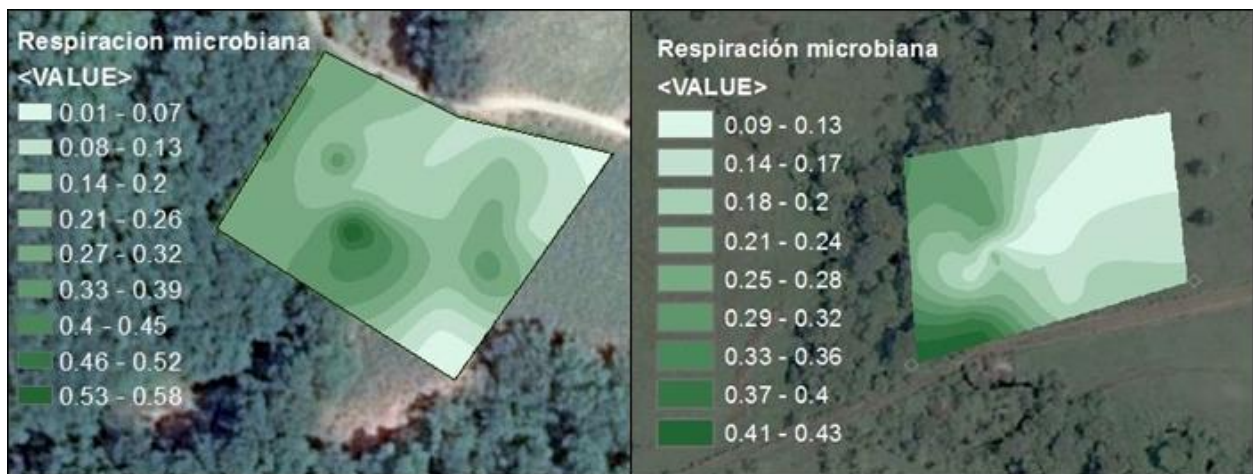


Figura 7. Distribución espacial de la respiración microbiana en las zonas estudiadas en los cantones de Jiménez (izquierda) y Sarapiquí (derecha).

Así, el ampliar el espectro de variables a estudiar es importante para contar con un estudio más integrado con la dinámica de los cultivos. De igual forma, tomar en cuenta otros cultivos de gran impacto en el país como el banano o trabajar en otros tipos de suelo, podría generar información valiosa para poder continuar con la generación de información sobre la aplicabilidad real de micetozoos en el contexto agrícola. En el presente trabajo limitaciones

logísticas y de tiempo no han permitido lo anterior, pero a partir del análisis realizado, se vislumbra su importancia.

Debido al poco estudio contextualizado de los micetozoos, cualquier línea de trabajo integrada tiene potencial de generar información interesante y potencialmente relevante. Al menos para el caso de Costa Rica y en el contexto agrícola, con las limitaciones del caso, este estudio representa un primer paso en esa dirección.

A modo de resumen se observó que la información con respecto a los micetozoos es mínima en relación con el uso de suelos de zonas tropicales. La investigación de este grupo de protozoarios es interesante ya que se desconoce sus posibles alcances. Los micetozoos pueden funcionar como indicadores ambientales, debido a su sensibilidad a variables como pH, respiración microbiana o cantidad de manganeso presente en el suelo, pero se debe estudiar su correcta implementación. En el caso de las dos primeras variables se observó una notoria distinción entre bosque y cultivo, lo cual se puede deber a las labores agrícolas que se realizan.

Los mixogastridos son el grupo que presentan una sensibilidad particular al manganeso relacionada con las dos zonas de cultivo. Pero los dictiostélidos son más receptivos a variables químicas. De igual forma los dictiostélidos predominan en todos los ambientes menos en el cultivo de piña. Lo cual es un indicador que el efecto del hombre en particular para este cultivo, está teniendo una influencia en la incidencia de este grupo.

En el caso de las variables paisajísticas como el NDVI, se mostró un crecimiento saludable de ambos cultivos, pero al momento del estudio considerando todos los parámetros, no mostró un peso específico en la incidencia de los micetozoos. Las dos zonas de estudio en su

mayoría son sectores agrícolas, pero el que los alrededores del muestreo presenten este escenario, no mostró tampoco un peso específico en la incidencia de los micetozoos.

Con los resultados encontrados, se recomienda ampliar el estudio a otros cultivos para ver si se presenta un comportamiento parecido en los micetozoos, investigar si otros ordenes de suelos muestran diferencias, realizar un estudio a pequeña escala, para observar la respuesta de los micetozoos variando cantidades de agroquímicos y considerar variables climáticas como precipitación, radiación o temperatura. Es importante recordar que este estudio es un primer paso para el inicio de la investigación de los micetozoos en ámbito agrícola, por lo que el fomentar el estudio de estos es importante para tener un panorama más amplio sobre este grupo.

Referencias

1. Arredondo-Ruiz F, García-Montero L, Valverde-Asenjo I, Menta C. Soil-Quality Indicators for Forest Management. In: Quantitative Techniques in Participatory Forest Management [Internet]. CRC Press; 2013. p. 179–240. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15366-5>
2. Krishna KR. SOIL MICROORGANISMS AND NUTRIENT DYNAMICS IN AGROECOSYSTEMS. In: Agroecosystems [Internet]. Apple Academic Press; 2013. p. 430–47. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b16300-37>
3. Kaleita AL, Schott LR, Hargreaves SK, Hofmockel KS. Differences in soil biological activity by terrain types at the sub-field scale in central Iowa US. PLoS One. 2017;12(7):1–13.
4. Dubey RK, Tripathi V, Abhilash PC. Book Review: Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture. Lugtenberg B, editor. Front Plant Sci [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 Nov 10;6(November):1–448. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-08575-3>
5. Figuerola ELM, Guerrero LD, Rosa SM, Simonetti L, Duval ME, Galantini JA, et al. Bacterial Indicator of Agricultural Management for Soil under No-Till Crop Production. PLoS One. 2012;7(11):1–12.
6. Colmenar E. Indicadores ambientales: el mejor diagnóstico. Ambient La Rev del Minist Medio Ambient [Internet]. 2002;(10):32–8. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=645993>

7. Gold M. Sustainable Agriculture: Definitions and Terms. In: Sustainable Agriculture and Food Supply [Internet]. Apple Academic Press; 2016. p. 3–16. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b19837-3>
8. Marinari S, Mancinelli R, Campiglia E, Grego S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecol Indic.* 2006;6(4):701–11.
9. Nielsen MN, Winding A. Microorganisms as indicators of soil health. [Internet]. NERI technical report. 2002. 1-85 p. Available from: <http://www.dmu.dk>
10. Kibblewhite M., Ritz K, Swift M. Soil health in agricultural systems. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2008;363(1492):685–701. Available from: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2007.2178>
11. Lareen A, Burton F, Schäfer P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol.* 2016;90(6):575–87.
12. Esteban GF, Finlay BJ, Warren A. Free-Living Protozoa. Thorp Covich's Freshw Invertebr Ecol Gen Biol Fourth Ed. Elsevier; 2014;1:113–32.
13. Romeralo M, Escalante R, Baldauf SL. Evolution and Diversity of Dictyostelid Social Amoebae. *Protist* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2012;163(3):327–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2011.09.004>
14. Stephenson SL, Fiore-Donno AM, Schnittler M. Myxomycetes in soil. *Soil Biol Biochem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;43(11):2237–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.007>

15. Cavalier-Smith T, Fiore-Donno AM, Chao E, Kudryavtsev A, Berney C, Snell EA, et al. Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2015 Feb;83:293–304. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790314002784>
16. Swanson AR, Vadell EM, Cavender JC. Global distribution of forest soil dictyostelids. *J Biogeogr* [Internet]. 1999 Jan;26(1):133–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2699.1999.00250.x>
17. Rojas C, Kryvomaz T. Myxomycetes in the 21st Century. In: Rojas C, Stephenson S, editors. *Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography and Ecology*. 1st ed. Academic Press; 2017. p. 466.
18. Fiore-Donno AM, Nikolaev SI, Nelson M, Pawlowski J, Cavalier-Smith T, Baldauf SL. Deep Phylogeny and Evolution of Slime Moulds (Mycetozoa). *Protist* [Internet]. Elsevier; 2010;161(1):55–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2009.05.002>
19. Clark J, Ef H. Myxomycete plasmodial biology : a review. 2015;6(October):643–57.
20. Feest A, SI S. The response of myxogastrids to soil amendments. 2014;5(November):821–9.
21. Uribe L. Uso de indicadores microbiológicos de suelos: ventajas y limitantes. 1999;2.
22. Guevara, A. Arce, R. Guevara P. *Impacto Económico, Social y Ambiental de la Piña en Costa Rica*. San Jose Costa Rica; 2017.
23. Chaves, M. Bermudez, L. Mendez D. Resultados de la zafra 2014-2015 [Internet]. 2015. Available from: [file:///C:/Users/balvarez/Downloads/Conexión-Información estadística](file:///C:/Users/balvarez/Downloads/Conexión-Información%20estadística)

2015_1712073646.pdf

24. Henríquez C, Cabalceta G, Bertsch F, Alvarado A. PRINCIPALES SUELOS DE COSTA RICA [Internet]. 2014. Available from: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/suelos-cr.html
25. Blokhuis W. Vertisols. In: Encyclopedia of Soil Science, Second Edition [Internet]. CRC Press; 2005. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/NOE0849338304.ch389>
26. Galbraith J, Engel R. Inceptisols. In: Encyclopedia of Soil Science, Second Edition [Internet]. CRC Press; 2005. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/NOE0849338304.ch175>
27. Pimentel M. Manipulating Ecosystems for Agriculture. In: Food, Energy, and Society, Third Edition [Internet]. CRC Press; 2007. p. 37–44. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420046687.ch5>
28. Reicosky D. Conservation agriculture. In: Climate Change and Terrestrial Carbon Sequestration in Central Asia [Internet]. Taylor & Francis; 2007. p. 199–209. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203932698.ch15>
29. Welbaum GE, Sturz A V., Dong Z, Nowak J. Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. CRC Crit Rev Plant Sci [Internet]. 2004 Mar;23(2):175–93. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680490433295>
30. Hoppe T, Schnittler M. Characterization of myxomycetes in two different soils by

- TRFLP- analysis of partial 18S rRNA gene sequences. 2015;6(April):216–27.
31. Eldor P. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. In: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry [Internet]. Elsevier; 2015. p. 1–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124159556000013>
 32. Mueller UG, Sachs JL. Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. Trends Microbiol [Internet]. 2015 Oct;23(10):606–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X15001729>
 33. Swanson AR, Vadell EM, Cavender JC. Global distribution of forest soil dictyostelids. J Biogeogr [Internet]. Blackwell Science Ltd; 1999;26(1):133–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00250.x>
 34. Rojas, C. y Kryvomaz T. Myxomycetes in the 21st Century. In: Stephenson S, Rojas C, editors. Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography and Ecology. 1st ed. EEUU: Academic Press; 2017. p. 470.
 35. Kryvomaz T, Stephenson S. Preliminary evaluation of the possible impact of climate change on myxomycetes. Pap Plant Pathol Univ Nebraska-Lincoln [Internet]. 2017 Feb 1;104(1):5–30. Available from: http://www.ingentaconnect.com/content/10.1127/nova_hedwigia/2016/0379
 36. Díaz-Romeu R. HA. Metodología de Muestreo de Suelos, Analisis Quimico de Suelos Y Tejido. 1982. p. 64.
 37. Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol Biochem [Internet]. 1987 Jan;19(6):703–7. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071787900526>

38. Jenkinson DS, Powlson DS. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 1976 Jan;8(3):209–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071776900055>
39. Henríquez C, Bertsch F, Salas R. *Fertilidad de suelos: manual de laboratorio*. 1st ed. Costa Rica: Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo; 1995. p. 64.
40. Whiting D, Wilson C, Card A. Estimating Soil Texture Sandy, Loamy, or Clayey? *Color Master Gard Progr Color Gard Certif Train C Fact Sheet #S14*. 2002;(December 2003):1–7.
41. Spiegel F, Haskins EF, Cavender JC, Landolt JC, Lindley-settlemyre L a, Edwards SM, et al. A beginner’s guide to isolating and culturing eumycetozoans. 2005; Available from: <papers://560067a4-156f-4d6d-b6cc-2f64c208798b/Paper/p167>
42. Tibshirani R. Regression selection and shrinkage via the lasso [Internet]. *Journal of the Royal Statistical Society B*. 1996. p. 267–88. Available from: <http://citeseer.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.35.7574>
43. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. *Elements* [Internet]. 2009;1:337–87. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b94608>
44. Subin U, Mathew JJ, Sajeshkumar NK, Vazhacharickal PJ. Pineapple (*Ananas comosus*) cultivation as an intercrop in rubber replant: effects on soil chemical and physical properties. *International Journal of Advanced Life Sciences (IJALS)*. 2014. p. 574–9.

45. Lee MH, Lee SB, Eo YD, Pyeon MW, Moon KI, Han SH. Analysis on the effect of Landsat NDVI by atmospheric correction methods. *Adv Civil, Archit Struct Constr Eng* [Internet]. 2016;375–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1201/b19961-80>
46. Reeder J, Franks C, Milchunas D. Root Biomass and Microbial Processes. In: *The Potential of US Grazing Lands to Sequester Carbon and Mitigate the Greenhouse Effect* [Internet]. CRC Press; 2000. p. 139–66. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9781420032468.ch6>
47. Stephenson SL. From morphological to molecular: studies of myxomycetes since the publication of the Martin and Alexopoulos (1969) monograph. *Fungal Divers* [Internet]. 2011 Sep 21;50(1):21–34. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13225-011-0113-1>
48. Keller HW, Everhart SE. Importance of Myxomycetes in Biological Research and Teaching. *Pap Plant Pathol Univ Nebraska-Lincoln* [Internet]. 2010;3(1):13–27. Available from: http://ever77.myweb.uga.edu/Publications/Everhart_2010_ImportanceofMyxomycetes.pdf
49. Crowley DE, Alvey SA. Regulation of microbial processes by soil pH. *Handb Plant Growth PH as Master Var* [Internet]. 2002;351. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Regulation+of+Microbial+Processes+by+Soil+pH#0>
50. Zhou L, Zhou X, Zhang B, Lu M, Luo Y, Liu L, et al. Different responses of soil respiration and its components to nitrogen addition among biomes: a meta-analysis. *Glob Chang Biol* [Internet]. 2014 Jul;20(7):2332–43. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1111/gcb.12490>

51. Wang X, Liu L, Piao S, Janssens IA, Tang J, Liu W, et al. Soil respiration under climate warming: differential response of heterotrophic and autotrophic respiration. *Glob Chang Biol* [Internet]. 2014 Oct;20(10):3229–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/gcb.12620>
52. Cardoso EJBN, Vasconcellos RLF, Bini D, Miyauchi MYH, Santos CA dos, Alves PRL, et al. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Sci Agric* [Internet]. 2013 Aug;70(4):274–89. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162013000400009&lng=en&tlng=en
53. Bunning S, Jimenez J. Indicators and Assessment of Soil Biodiversity/Soil Ecosystem Functioning for Farmers and Governments. In: OECD Expert Meeting on indicators of Soil Erosion and Soil Biodiversity. Rome Italy; 2003. p. 22.
54. Kladivko EJ. Tillage systems and soil ecology. *Soil Tillage Res*. 2001;61(1–2):61–76.
55. Brussaard L. Interrelationships Between Soil Structure, Soil Organisms, and Plants in Sustainable Agriculture. In 1997. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420049237.ch1>
56. Gold M V. Sustainable Agriculture : The Basics. 1990;45(1).
57. Verhulst N, Govaerts B, Verachtert E, Castellanos-Navarrete A, Mezzalama M, Wall PC, et al. Conservation Agriculture, Improving Soil Quality for Sustainable Production Systems? In: Food Security and Soil Quality [Internet]. CRC Press; 2010. p. 137–208.

Available from: <https://doi.org/10.1201/EBK1439800577-c7>

58. Kennedy A. Microbial Diversity in Agroecosystem Quality. In: Biodiversity in Agroecosystems [Internet]. CRC Press; 1998. Available from: <https://doi.org/10.1201/9781420049244.ch1>
59. Galbraith J, Engel R. Inceptisols. In: Encyclopedia of Soil Science, Second Edition [Internet]. CRC Press; 2005. Available from: <https://doi.org/10.1201/NOE0849338304.ch175>
60. Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Lan DI L, Pietramellar G, Renell G. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* [Internet]. 2003;54(December):655. Available from: [10.1046/j.13510754.2003.0556.x%5Cnhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=11414859&site=ehost-live](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=11414859&site=ehost-live)

Anexos

1. Pruebas de laboratorio

1.1. Biomasa microbiana

La biomasa microbiana se determinó con la metodología de fumigación y extracción de Vance (37). Para ello se pesaron 10g de muestra por duplicado. La primera muestra sirvió de control, para lo cual se trabajó con un Erlenmeyer de 250mL al cual se le adicionaron 50mL de K_2SO_4 (0,5M). Tras agitación por 30 minutos y filtración usando un papel de filtro Whatman 42, el extracto se guardó a 4°C. La segunda muestra fue la fumigada, para la cual se usó un beaker de 40mL al cual se fumigó con cloroformo y se incubó por 24h a 25°C. Tras ello se filtró con el papel Whatman y del extracto obtenido se colocaron 8mL en tubos de digestión a los que se adicionaron 2mL de $K_2Cr_2O_7$. Las muestras fueron digeridas a 150°C por 30 minutos para después dejar enfriar. El digestado se transfirió a un Erlenmeyer de 250mL, al cual se le adicionaron 80mL de agua desionizada, tres gotas de fenontralina y se tituló la solución con sal de Mohr 33,3 mM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_6 \cdot 6(H_2O)$.

1.2. Respiración microbiana

La respiración microbiana se determinó usando la metodología de Jenkinson y Powlson (38). Para ello se pesaron 30g de suelo por duplicado y se colocaron en una jarra de incubación. En el centro del recipiente se colocó un vaso de precipitado con 10ml de NaOH, se cerró el envase y se dejó dentro de una incubadora a 28°C por dos horas. Al destapar el recipiente se procedió a sacar el vaso con NaOH y se transfirió a un Erlenmeyer de 125ml al cual se le agregó 2ml de $BaCl_2$ con una bureta de 10ml y 3 gotas de timolftaleína con gotero. Esta solución se tituló con HCL en una bureta de 50ml hasta ver un cambio de azul claro a incoloro. El cálculo de

la respiración microbiana se realizó con la ecuación de Stotzky (1965), para obtener valores de CO₂ en mg C/ kg suelo.

$$\text{Miligramos de } C - CO_2 = (B - V) * NE \quad (1)$$

Dónde:

B: volumen en mililitros de HCl necesarios para valorar el NaOH sin ser expuesto al suelo.

V: volumen en mililitros de HCl necesarios para valorar el NaOH siendo expuesto al suelo.

N: normalidad del HCl

E: peso específico del carbono (E=12) y peso específico del CO₂ (Ez =44)

$$E = \frac{44}{2} - \frac{12}{2}$$

$$E = 16$$

13. Metodología modificada del protocolo de Cavender.

La metodología utilizada fue la de Spiegel (41). Para ello se pesaron 5g de suelo por muestra y se adicionaron 25ml de agua, se mezcló bien la solución y se pasó una pequeña cantidad en un plato de petri doble con agar-heno y se procedió a inocular con las bacterias. *Escherichia coli* en una sección del plato y *Bacillus subtilis* en la otra, además se agregaron hojas de bosque autoclavadas como sustrato. Se revisaron los platos tras una y dos semanas de haber montado el ensayo y con ayuda de un microscopio se identificaron los microorganismos a nivel de grupo.

1.4. Textura del suelo

La metodología utilizada fue el protocolo grueso de la Unidad de Recursos Forestales del Instituto de Investigaciones en Ingeniería según el cual se tomó suelo de la muestra para cernirlo, secarlo en papel periódico y pulverizarlo. Tras esto, se tomó un recipiente alto y se llenó ¼ parte del mismo con el suelo para después añadir 350mL de agua y una cucharadita de detergente para lavadora automática de platos y cristalería. El recipiente se cerró y se agitó por 15 minutos para después de un minuto medir el nivel asociado con la cantidad de arena, tras dos horas el nivel de limo y después de 3 días el nivel de arcilla. El recipiente no tuvo perturbaciones para garantizar la correcta deposición de las diferentes partículas.

Seguido a esto se calculó el porcentaje de partículas con respecto al nivel de los sedimentos utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Porcentaje de Arcilla} = \frac{\text{grosor de capa de arcillas}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (2)$$

$$\text{Porcentaje de Limo} = \frac{\text{grosor de capa de limos}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (3)$$

$$\text{Porcentaje de Arenas} = \frac{\text{grosor de capa de arenas}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (4)$$

Por último se obtuvo el tipo de textura de cada muestra por medio del cuadro de textura.

1.5. Retención de agua en el suelo

La metodología utilizada fue la de la Unidad de Recursos Forestales del Instituto de Investigaciones en Ingeniería. Para lo anterior se tomaron 100g de suelo para cernirlo y colocarlo en un sobre donde se secó la muestra a 60°C por 48 horas. Al momento de pasar este tiempo se sacó del horno y se dejó en un desecador por 15 minutos. En una probeta de 100ml se colocó un embudo hecho con papel de filtro (#4).

De la muestra de suelo se tomaron 20g y se colocaron en el cono del papel de filtro. Se tomó un beaker de 150ml y se llenó con agua hasta los 100ml, luego se procedió a verter lentamente el líquido sobre la muestra en el papel filtro. Al momento de verter todo el líquido en el filtro se dejó reposar por cinco minutos y se midió en la probeta el volumen que pasó por el filtro. Por último se estimó la relación de agua retenida utilizando la ecuación 5:

$$\frac{96 \text{ ml} - \text{cantidad de agua en probeta}(5 \text{ min})}{20 \text{ g suelo}} = \frac{\text{ml agua}}{\text{g suelo}} \quad (5)$$

1.6. pH.

El pH se midió por medio del procedimiento de Henríquez, Bertsch y Salas (39), según el cual se midió 10ml de suelo que se colocaron en un vaso de agitación con 25ml de agua destilada para una relación de 1:2.5. La solución se agitó por 15 minutos y se dejó reposar otros 5 minutos para que se estabilizara el suelo. Se procedió a calibrar el pHmetro con dos buffer de 4 y 7 a temperatura ambiente. La medición del pH se realizó introduciendo el electrodo en la solución, tomando el dato y lavando para determinar la siguiente medición.

1.7 Pruebas químicas

Las pruebas químicas las hicieron en el Centro de Investigaciones Agronómicas donde los encargados mencionan que la metodología a seguir es la siguiente. Se sacó una cierta cantidad de suelo seco y molido para colocarlo en un vaso de extracción. Le agregaron solución Mehlich 3 en proporción 1:1 y se agitó por 10 minutos. Se filtró la muestra y se colocó en los recipientes del espectrómetro de emisión atómica de plasma (ICP-OES) y mediante de curvas de calibración apropiadas para cada elemento, el equipo realizó una lectura de Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio, Sodio, Hierro, Cobre, Zinc, Manganeso, Boro y Azufre obteniendo los resultados de concentración de cada uno de ellos.

1.8. Teledetección

Se hizo un estudio de variables paisajísticas para cada zona de estudio por medio de los programas Google Earth PRO versión 7.1.7.2606, QGIS 2.8.7-Wien y ArcGis 10.3.1.4959. Las imágenes satelitales usadas fueron de Landsat 8 y se obtuvieron de la página de Earth Explorer de la USGS en fechas cercanas a los muestreos y con visibilidad para el trabajo.

Para cada lugar se obtuvo el uso de suelos para un área de 1000 m², donde el centro fue cada zona de muestreo. Con este procedimiento se identificaron edificios, bosques, fuentes de agua y áreas agropecuarias y se obtuvieron los porcentajes de uso de la tierra para cada categoría. Utilizando la información en las bandas roja e infrarroja se calculó Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI).

1.9. Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

El índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) se calculó en un área aproximada de 1 ha alrededor de cada una de las zonas de muestreo. Se utilizó el programa ArcGis y QGIS con las imágenes de Lansat 8 de las fechas 3 abril y 16 junio del 2016 por ser las más cercanas a las fechas de muestreo y que no presentaron problemas de nubosidad. Dentro de cada una de estas imágenes se escogieron 24 pixeles al azar, de los cuales la mitad se ubicaron en el bosque y el resto en la zona de cultivo y con ellos se obtuvo el índice mencionado.