

Aplicación de la técnica Biolog™ ECO-plate para el estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas del suelo agrícola

E. Baraza^{1,*}, J. Bota¹, A. Romero-Munar¹, B. Nogales¹.

(1) Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de las Islas Baleares, Crta. de Valldemossa, Km 7.5, 07122 Palma, España.

* Autor de correspondencia: E. Baraza [elena.baraza@uib.es]

> Recibido el 29 de enero de 2019 - Aceptado el 07 de mayo de 2019

Baraza, E., Bota, J., Romero-Munar, A., Nogales, B. 2019. Aplicación de la técnica Biolog™ ECO-plate para el estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas del suelo agrícola. *Ecosistemas* 28(3):46-53. Doi.: 10.7818/ECOS.1687

Existen distintas técnicas para el estudio de las comunidades microbianas del suelo. En la presente revisión se pretende, por un lado, mostrar el desarrollo histórico de algunas de las técnicas usadas para analizar el perfil fisiológico de comunidades microbianas y por otro analizar de modo específico el uso de microplacas ECO-plate, de Biolog™. Se analizan los puntos claves de la aplicación de esta metodología al análisis de suelos en agroecosistemas. La revisión de múltiples trabajos centrados en la implementación de esta metodología muestra como el protocolo utilizado, tanto para la obtención de datos como para su análisis, condiciona las conclusiones que se pueden derivar de los resultados, siendo necesario un buen conocimiento de la técnica para una correcta interpretación de los mismos. Por eso consideramos necesario tener en cuenta las recomendaciones aportadas y mantener un protocolo óptimo y común que facilite la comparación entre estudios.

Palabras clave: diversidad microbiana; diversidad funcional; microplacas; densidad óptica; salud del suelo

Baraza, E., Bota, J., Romero-Munar, A., Nogales, B. 2019. Application of the Biolog™ ECO-plate technique for the study of the physiological profile of microbial communities in agricultural land. *Ecosistemas* 28(3):46-53. Doi.: 10.7818/ECOS.1687

Today, there are easy and inexpensive techniques for the study of microbial communities from soils. The present review, on the one hand, shows the historical development of some of the techniques used to analyze the physiological profile of microbial communities and, on the other hand, analyzes the use of Biolog™ ECO-plate microplates specifically. The key points of the application of this methodology to soil analysis in agroecosystems are examined. The review of multiple articles focused on the implementation of this methodology shows how the protocol used, both for obtaining data and for its analysis, determines the conclusions that can be derived from the results. It is necessary a good knowledge of the technique for its correct interpretation. Therefore, we consider it necessary to take into account the recommendations made and maintain an optimal and common protocol that facilitates the comparison between studies.

Key words: microbial diversity; functional diversity; microplates; optical density; soil health

La importancia de las comunidades bacterianas del suelo en los flujos de nutrientes y energía de los ecosistemas naturales ha sido ampliamente demostrada. Los microbios del suelo son importantes reguladores de la productividad, la dinámica de la comunidad vegetal y la diversidad de plantas (Van der Heijden et al. 2008). Sin embargo, en agronomía su estudio ha sido reciente, cobrando importancia en los últimos años, sobre todo bajo el enfoque agroecológico (Bender et al. 2016). La fertilidad del suelo, los flujos de gases de efecto invernadero o la neutralización de contaminantes en agroecosistemas son procesos cada vez más estudiados en los que las comunidades microbianas juegan un papel principal (Bender y Van der Heijden 2015; Rutgers et al. 2016; Srivastava et al. 2017). Las técnicas han avanzado permitiendo que el estudio de las comunidades microbianas sea asequible y fácil para los investigadores de diversas disciplinas, lo que ha aumentado el número de publicaciones en las que se analiza la diversidad taxonómica y funcional bacteriana. Sin embargo, a pesar de la aparente simplicidad de algunas técnicas, es necesario un conocimiento amplio de su funcionamiento para poder interpretar adecuadamente los resultados obtenidos. En la presente revisión se pretende, por un

lado, mostrar el desarrollo histórico de algunas de las técnicas usadas para analizar el perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPPs por sus siglas en inglés Community Level Physiological Profiles) y por otro analizar de modo específico el uso de la técnica Biolog™, principalmente con microplacas ECO-plate™. Se mostrarán los puntos clave que se deben considerar a la hora de implementar esta técnica con muestras de suelo. Se considerará cómo el protocolo utilizado, tanto para la obtención de datos como para su análisis, condiciona las conclusiones que se pueden derivar de los resultados.

Contexto histórico del análisis CLPP en muestras de suelo

A principio de la década de los 90 se reconocía ampliamente que los métodos de estudio de microorganismos basados en cultivo eran insuficientes para describir la diversidad taxonómica y funcional de comunidades microbianas (Torsvik et al. 1990). Hasta la introducción de las técnicas basadas en ácidos nucleicos, el método más utilizado para realizar comparaciones en composición de co-

comunidades microbianas era el análisis cuantitativo de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA, de las siglas en inglés) (Hedrick et al. 2007). Este método carece de resolución suficiente para distinguir los diferentes microorganismos presentes en una muestra ya que muchos comparten los mismos patrones de PFLA. No obstante, permite diferenciar algunos grupos de microorganismos que tienen PFLA característicos como, por ejemplo, bacterias reductoras de sulfato, arqueas, metanótrofos, actinomicetos, fotótrofos o eucariotas. Una de las ventajas del análisis de lípidos es que también permite estudiar el estado nutricional o fisiológico de las comunidades, por ejemplo, cuantificando la proporción entre la cantidad del polímero de reserva PHA (polihidroxialcanoato) y los PFLA, o bien por la presencia de PFLA que son indicativos de situaciones de estrés. El análisis de PFLA es complejo y la interpretación de los resultados requiere de un buen conocimiento de la técnica y del ambiente del cual se ha obtenido la muestra. Técnicamente se necesitan realizar extracciones con reactivos de coste económico elevado y utilizar equipos costosos para la extracción y la cuantificación, que se realiza por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS). Debido al nivel de especialización necesario y a su coste económico el análisis de PFLA no era una técnica ampliamente distribuida en la década de los años 90, aunque sigue plenamente vigente en la actualidad.

La introducción de métodos de biología molecular basados inicialmente en hibridación ADN-ADN o en cinéticas de reasociación de ADN y posteriormente en el análisis de ARN ribosómico o de sus genes codificantes, supuso una aproximación nueva para el análisis de la composición taxonómica de las comunidades microbianas (revisado en Liu y Stahl 2007). Pero, durante la década de los 90 estas técnicas también eran costosas por lo que su uso no estaba extendido en la comunidad científica y limitaba el número de muestras de suelo a analizar. El desarrollo de métodos electroforéticos para la obtención de patrones moleculares (“community fingerprinting”) facilitó la realización de estudios comparativos de comunidades microbianas (Liu y Stahl 2007). No obstante, quedó patente desde el primer momento que los métodos moleculares proporcionaban información limitada sobre la funcionalidad de comunidades microbianas por varias razones. La primera es que si los análisis se basan en la detección de ADN (genes) no se puede tener la certeza de que hubiese expresión de esos genes, y por tanto función, en el ambiente. Por otra parte, los análisis basados en secuencias de ARN ribosómico proporcionan información taxonómica o filogenética pero no funcional. Tan solo se puede inferir una función para algunos grupos filogenéticos (ej. cianobacterias) pero no para la mayoría de microorganismos. Esto puede solventarse utilizando marcadores moleculares que sean indicativos de una función relevante en el ambiente como por ejemplo la fijación de nitrógeno.

En el contexto del funcionamiento de comunidades complejas como el suelo, es la función de los microorganismos lo que tiene relevancia para el ecosistema y no tanto la composición taxonómica. Por lo tanto, se necesitaban aproximaciones metodológicas alternativas que proporcionasen información de la actividad de las comunidades microbianas, permitiesen evidenciar diferentes grupos funcionales y establecer comparaciones entre diferentes muestras. Idealmente estos métodos debían ser lo suficientemente sencillos como para que se pudiesen implementar fácilmente y con un coste económico asumible. La propuesta de la utilización de placas Biolog™ como aproximación a la caracterización funcional y el análisis de la estructura de comunidades microbianas (Garland y Mills 1991) intentaba dar respuesta a esta necesidad.

Las placas Biolog™ (Biolog Inc.) se empezaron a comercializar a finales de los años 80 como un método rápido de identificación y caracterización de bacterias de interés humano y clínico (Bochner 1989). El ensayo se realiza en microplacas de 96 pocillos que contienen hasta 95 fuentes de carbono y un control en un medio de cultivo deshidratado que contiene una sal de tetrazolio. Las placas se inoculan con suspensiones de bacterias aisladas en cultivo puro y se incuban un tiempo corto 4-24 h. El método detecta si las bacterias son capaces de oxidar las diferentes fuentes de carbono.

En ese caso hay una transferencia de electrones de la cadena de transporte electrónico respiratorio a la sal de tetrazolio del medio, produciéndose un cambio de color que se mide en términos de absorbancia —en general a 590 nm— en lectores de microplacas. La comparación de los resultados con una base de datos proporcionada por la compañía permite la identificación de las bacterias. La compañía proporciona diferentes formatos de placas para diferentes grupos microbianos de interés clínico como por ejemplo para bacterias gram-negativas (Biolog GN™) que fueron las placas que se utilizaron en el estudio de Garland y Mills (1991). La utilidad del método Biolog™ para la caracterización de comunidades microbianas de suelo, demostrada por estos autores, la simplicidad técnica de su implementación y su coste económico moderado hizo que el método se implementase rápidamente. El interés de microbiólogos ambientales, y en particular microbiólogos de suelo, en esta metodología hizo que la compañía desarrollase nuevas placas más adecuadas al ensayo de muestras ambientales como placas sin sustrato para que el usuario decidiese el panel de fuentes de carbono a ensayar (placas Biolog MT™) o las placas ECO-plate™ que contienen 31 fuentes de carbono relevantes en un contexto ambiental. Cada una de estas fuentes de carbono, además del blanco, está por triplicado en la placa. En comparación con las placas GN esto supone una importante reducción del número de sustratos, pero no el número de placas necesarias ya que se debe usar la media de absorbancia de los valores obtenidos de las tres réplicas dentro de la misma placa, lo que aumenta la probabilidad de que el CLPP generado sea representativo de la muestra de suelo evaluada. Los resultados de diversos trabajos muestran que el número y la diversidad de sustratos contenidos en la placa ECO-plate™ son suficientes para distinguir entre las comunidades microbianas encontradas en muestras ambientales contrastantes (Classen et al. 2003; Dong et al. 2008; Rutgers et al. 2016). Así por ejemplo Dong y colaboradores (2008) en un estudio comparativo entre diversas técnicas mostró resultados similares en términos del efecto del cambio de uso de la tierra sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo utilizando Biolog ECO-plate™, electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) de genes para 16S rRNA o análisis de perfiles de ácidos grasos (PLFA). En la actualidad el método Biolog™ está completamente vigente, tanto para la identificación y caracterización fenotípica de bacterias como para el análisis de comunidades microbianas (Fig. 1).

Se han desarrollado métodos alternativos para la determinación de CLPPs en suelos. Estos métodos se basan en la observación de que diferentes compuestos orgánicos estimulan la respiración microbiana aeróbica y esto puede ser analizado en incubaciones de muestras de suelo (Anderson y Domsch 1973). Basándose en esta “respiración inducida por múltiples sustratos” (SIR, de las siglas en inglés) se han propuesto métodos que valoran tanto la producción de CO₂ como el consumo de O₂ en suelos.

La primera aproximación para analizar la diversidad catabólica en suelos basada en SIR y medición de CO₂ se publicó en el año 1997 (Degens y Harris 1997) y sigue utilizándose en la actualidad. El método consiste en la incubación de muestras de suelo en pequeñas botellas a las que se añaden diferentes sustratos. La medición de CO₂ se realizaba por cromatografía de gases. Aunque este método tiene buena resolución tiene el inconveniente de que es laborioso, no es miniaturizado y requiere de la utilización de técnicas analíticas costosas. Estos inconvenientes se solventaron con el método Microresp™ (Campbell et al. 2003) que utiliza placas multipocillo para la incubación de muestras de suelo directamente y detección colorimétrica de la producción de CO₂ (Rowell 1995) por lo que las lecturas se realizan en un lector de microplacas convencional. Midiendo la reacción colorimétrica de concentraciones conocidas de CO₂ se puede elaborar una curva patrón y determinar la concentración producida tras exposición a cada sustrato. Una desventaja importante del método Microresp™ es que no se recomienda para suelos carbonatados por las interferencias que puede dar en la detección de CO₂, aunque se han propuesto correcciones para este tipo de suelos (Oren y Steinberger 2008; Renault et al. 2013).

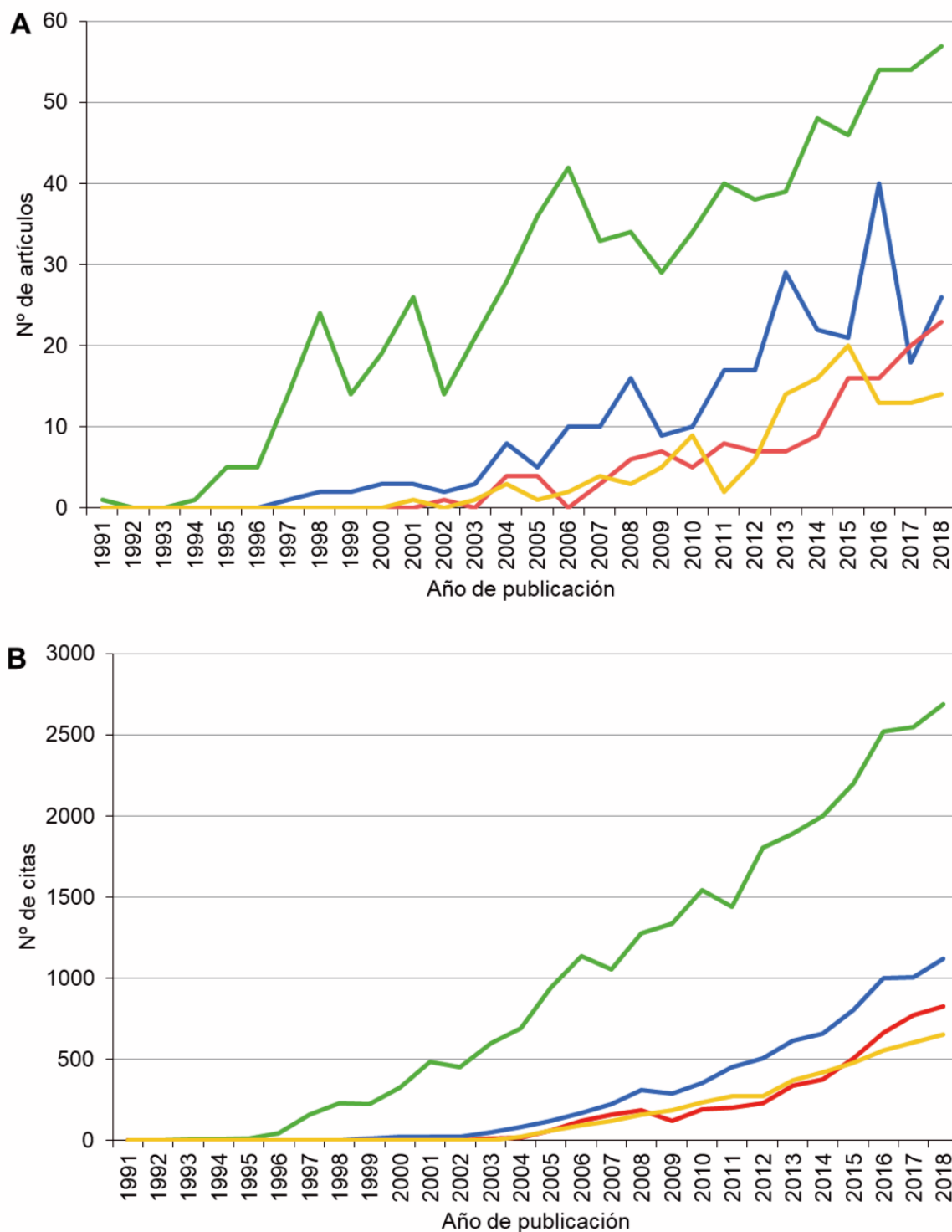


Figura 1. Comparación de publicaciones en las que se hace referencia a diferentes métodos para CLPP (sistema Biolog y SRI basada en producción de CO_2), metagenómica funcional (secuenciación y clonaje) e hibridación en biochips para el análisis de muestras de suelos. Panel A: número de publicaciones; Panel B: número de citas. Los datos se obtuvieron de la base de datos de Web of Science [acceso abril 2019] con los criterios de búsqueda "Ecoplate and soil", o "Microresp and soil", "functional metagenomics and soil", y "Geochip and soil". Además, se recuperaron los artículos que citaban la primera publicación sobre cada método en estudios de suelos (referencias Garland y Mills 1991; Degens y Harris 1997; Campbell et al 2003; Gillespie et al. 2002; Wu et al. 2001). Solo se incluyeron artículos de investigación en los que estas técnicas se utilizaron en estudios de suelos y estaban escritas en inglés. Verde: Biolog (756 artículos); azul, SRI (274 artículos); rojo, metagenómica funcional (136 artículos); naranja, biochip (127 artículos).

Figure 1. Comparison of publications that refer to different CLPP methods (Biolog system and SRI based on CO_2 production), functional metagenomics (sequencing and cloning) and hybridization in arrays for the analysis of soil samples. Panel A: number of publications; Panel B: number of citations. The data were obtained from the Web of Science database [access April 2019] with the search criteria "Ecoplate and soil", "Microresp and soil", "functional metagenomics and soil", "Geochip and soil". In addition, we collected the articles citing the first report of each method in soil studies (references Garland y Mills 1991; Degens y Harris 1997; Campbell et al 2003; Gillespie et al. 2002; Wu et al. 2001). We included only research articles using these techniques in soil analysis and were written in English. Green, Biolog (756 articles); blue, SRI (274 articles), red, functional metagenomics (136 articles); orange, array (127 articles).

En el año 2003 se propuso otro método miniaturizado basado en el análisis de consumo de oxígeno. La detección se basa en la utilización de fluoróforos sensibles a la concentración de oxígeno por lo que se requiere disponer de un lector de microplacas que pueda medir fluorescencia (Garland et al. 2003). En estos experimentos se observa un incremento de la fluorescencia a medida que se consume el oxígeno. El parámetro de trabajo es una medida de fluorescencia normalizada, por ejemplo, respecto a fluorescencia basal a tiempos de incubación cortos (Zabaloy et al. 2008). No se ha descrito la posibilidad de realizar curvas de calibración para transformar las medidas de fluorescencia en concentración de oxígeno. Una de las ventajas de este método es que tiene mayor sensibilidad dado que la detección se basa en fluorescencia. Por esta razón permite la utilización de concentraciones de sustrato entre 10 y 100 veces inferiores a Microresp™ y Biolog™. En comparación con Microresp™, este método tiene tiempos de incubación más largos (típicamente 20-24 h frente a las 6 h de Microresp™) y se realiza con una suspensión de suelo y no con suelo directamente. Por otra parte, las placas de detección de CO₂ que utiliza Microresp™ las prepara el usuario utilizando reactivos químicos de bajo coste y pueden leerse con el mismo tipo de lectores que las placas Biolog™. Esto permite la combinación de ambos métodos si se desea. En cambio, para la detección de O₂ se utilizaban inicialmente placas comerciales que ya no están disponibles. Aunque se han descrito métodos no comerciales (McLamore et al. 2014) debe tenerse en cuenta el coste del fluoróforo y que la preparación de las placas para la detección tiene una cierta complicación.

Las dos aproximaciones basadas en medidas de respiración tienen ventajas sobre las placas Biolog™ para CLPP. En primer lugar, la detección de la actividad es directa (CO₂/O₂) y no indirecta vía la reducción de una sal de tetrazolio. Además, el usuario puede decidir las fuentes de carbono y las concentraciones que desea utilizar en cada experimento, lo que proporciona más versatilidad y ofrece la posibilidad de utilizar concentraciones más realistas en el contexto del suelo. Otra de las ventajas de los métodos basados en respiración es que utilizan directamente muestras de suelo (o suspensiones de suelo) sin necesidad de hacer un paso previo de extracción y dilución de los microorganismos del suelo. Esto evita algunos de los problemas asociados al sistema Biolog™ que se discuten en el apartado siguiente. Por otra parte, a diferencia de Biolog™, se utilizan tiempos de incubación cortos (sobre todo en el caso de Microresp™ que es de 6 h). Con estas incubaciones cortas lo que se valora es la actividad inicial de la comunidad al añadir diferentes fuentes de carbono, sin que haya tiempo para que se produzca crecimiento. Esto evita otra de las limitaciones del sistema Biolog™ como es la selección de bacterias de rápido crecimiento o el sesgo que se introduce ya que no todas las poblaciones microbianas del suelo pueden crecer en los pocillos de las placas Biolog™ (Smalla et al. 1998; Chapman et al. 2007). Otra limitación es que las placas Biolog™ están tamponadas a pH 7,2 por lo que resultan adecuadas para microorganismos de suelos neutros. En cambio, los sistemas basados en respiración no tienen problema con los ensayos de suelos ácidos o alcalinos. En contrapartida, las placas Biolog™ son un método altamente estandarizado, lo cual puede ser interesante en proyectos de comparación de diferentes suelos o en la realización de series temporales. Además, el método Biolog™ permite automatización lo que aumenta el rendimiento y permite abordar proyectos con un elevado número de muestras. De hecho, el método Biolog™ sigue siendo ampliamente utilizado (Fig. 1) ya que su implementación parece más sencilla a simple vista. Sin embargo, considerando sus limitaciones, su protocolo de uso debe ser optimizado a fin de minimizarlas y mejorar la interpretación de los resultados.

CLPP en el contexto de las técnicas “ómicas”

Actualmente estamos inmersos en la revolución de las técnicas “ómicas”. Podemos estudiar comunidades microbianas en base a los genes de los microorganismos (metagenómica), su transcripción a mRNA (metatranscriptómica), su traducción a proteínas (metaproteómica), o los metabolitos resultantes de su actividad (metaboló-

mica). Por lo que respecta a la funcionalidad de comunidades lo más habitual son estudios metagenómicos porque son más sencillos, aunque solo muestren funciones potenciales de la comunidad. La primera aproximación consiste en secuenciación de ADN total de la comunidad, generando miles de secuencias. La predicción de funciones se basa en el grado de homología con secuencias de bases de datos. La segunda aproximación consiste en el clonaje y expresión del ADN de la comunidad para detección de una función concreta (ej. proteasas, lipasas). La tercera consiste en la hibridación del ADN de la comunidad en biochips que contienen miles de sondas que detectan familias de genes funcionales (Hazen et al. 2013; Ngara y Zhang 2018). La cantidad de información que proporcionan la metagenómica o la metatranscriptómica es indiscutible. Pero, aunque los costes de secuenciación se han abaratado, la tecnología es compleja y para la mayoría de los investigadores queda limitada a unas pocas muestras. La selección de qué muestras analizar por metagenómica no es sencilla y podría basarse por ejemplo en resultados de CLPP. Por otra parte, los resultados de la metagenómica no son inmediatos, el análisis es complejo y se necesita inversión en recursos computacionales. Teniendo en cuenta la dinámica de publicaciones de estudios que utilizan CLPP o metagenómica (Fig. 1) no parece probable que, al menos en la próxima década los métodos de CLPP queden obsoletos.

Consideraciones metodológicas del uso de ECO-plate™ para el análisis CLPP

El uso de placas ECO-plate™ para el estudio del perfil fisiológico de comunidades bacterianas ha sido ampliamente aplicado en diversas disciplinas científicas gracias a la sencillez de la metodología. Sin embargo, es precisamente la aparente sencillez del método lo que hace que incremente la probabilidad de errores metodológicos o de interpretación. De hecho, diversos trabajos (Preston-Mafham et al. 2002; Stefanowicz 2006; Weber y Legge 2010; Xu et al 2015) proporcionan consejos para optimizar su uso y sobre todo mejorar la interpretación de sus resultados.

En el caso de la agroecología el principal uso de este método es el estudio comparativo de comunidades microbianas del suelo. Se ha aplicado al análisis del efecto de diversos tipos de fertilización (O'Donnell et al. 2001; Dan et al. 2008), el efecto de pesticidas o herbicidas (Floch et al. 2011; Jacobsen y Hjelmsø 2014), el impacto de cultivos transgénicos (Mulder et al. 2006; Wei et al. 2012), la influencia de diversos manejos del suelo (Van Eekeren et al. 2008; Nair y Ngouajio 2012) etc, sobre la diversidad funcional microbiana y la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. El muestreo del suelo tiene sus características peculiares, ya que tras su recolección se debe obtener una suspensión líquida que contenga el máximo de diversidad microbiana existente en el suelo y con el máximo de componentes de la comunidad microbiana, pero lo más limpia posible, siendo necesario un protocolo de desprendimiento y/o homogeneización apropiado.

A la hora del muestreo en campo es importante considerar que el suelo puede contener distinta humedad por lo que muestras idénticas en peso pueden ser distintas en contenido de suelo, dificultando su comparación. Lo ideal sería conocer el contenido hídrico de las muestras y ajustar las cantidades a inocular al mismo, pero esto no es siempre posible y de hecho es poco habitual en los trabajos publicados esta consideración. Medidas de humedad del suelo en campo en el momento de la recolección o procurar homogeneizar las condiciones de muestreo son las dos alternativas más sencillas para mejorar la toma de muestras.

El tiempo entre el muestreo y la inoculación debe ser reducido al máximo para evitar la muerte de células y cambios en la estructura de la comunidad. Xu y colaboradores (2015) recomiendan mantener refrigeradas las muestras tras su recolección e inocularlas dentro de los 2 días siguientes. Para Preston-Mafham y colaboradores (2002), la inoculación debe hacerse en el mismo día. El almacenaje de muestras antes de la inoculación no sería recomendable, ya que puede derivar en una disminución diferencial de las

distintas poblaciones de microorganismos. Así, [Shishido y Chanway \(1998\)](#) encontraron que la actividad biológica del suelo, medida como diversidad de utilización de sustratos calculados a partir de ECO-plate™ es menor en suelos almacenados durante 32 semanas que en suelos frescos, aunque esta disminución fue menor después del almacenamiento congelado (-10 °C) en comparación con el almacenamiento en frío (4 °C). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las comunidades microbianas reflejan las condiciones ambientales justo antes del muestreo, especialmente en los horizontes poco profundos del suelo. Así, en trabajos que requieran un monitoreo en el tiempo o comparaciones entre localizaciones alejadas, se recomienda incluir un período de incubación en condiciones estandarizadas en el laboratorio ([Rutgers et al. 2016](#)). Hay que tener en cuenta que en estos casos se analiza la funcionalidad de la comunidad microbiana que se desarrolla en estos suelos bajo las condiciones de incubación, incluyendo especies que pudieran estar en formas de resistencia en el momento de recolección de las muestras de suelo. Por ejemplo, en la Red de Monitoreo de Suelos de los Países Bajos, las muestras de suelo tamizadas se incubaron durante 4 semanas a 10 °C ([Rutgers et al. 2006](#)), con el objeto de minimizar el efecto de las grandes diferencias climáticas (como la lluvia y la temperatura) en las semanas previas al muestreo ([Bloem y Breure 2003](#)). En estudios donde se pretende evaluar el efecto de un agente estresante, previo a la inoculación hay un período de incubación del suelo en condiciones de oscuridad y 25-30 °C que llega a durar incluso 50 días ([Yang et al. 2013](#)).

A la hora de generar la suspensión bacteriana a partir del suelo es importante considerar que esta debe tener una densidad celular óptima. Un exceso de células genera tasas de coloración muy rápidas que no permiten identificar diferencias entre tratamientos, mientras que un bajo número de células no permite el desarrollo de coloración en tiempos de incubación prudentes ([Weber y Legge 2010](#)). Además, una dilución no apropiada puede suponer la pérdida de aquellos microorganismos menos abundantes ([Garland et al. 2001](#)). Si bien mayormente la dilución escogida va de 10^{-2} a 10^{-4} , lo aconsejable es realizar estudios piloto que permitan determinar el nivel de dilución óptimo para cada tipo de suelo.

Diversos trabajos utilizan distintas soluciones para realizar la suspensión de suelo, desde agua destilada estéril ([Capó-Bauçà et al. 2019](#)), solución salina estéril de 0,9 o 0,85 % ([Nair y Ngouajio 2012](#); [Feigl et al. 2017](#)), o un tampón 10 mM BisTris, pH 7 ([Van Eekeren et al. 2008](#)). Los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas pueden diferir entre sí debido al uso de diferentes tampones. Por tanto, la elección de la solución extractora también va a depender del tipo de estudio a llevar a cabo. Así, en suelos contaminados con zinc, [Kelly y Tate \(1998\)](#) vieron que el fósforo presente en el tampón fosfato utilizado reaccionaba con el zinc precipitando y dificultando así las lecturas. Por otro lado, el uso de agua destilada estéril ha sido utilizado con buenos resultados en estudios para la comparación de tratamientos ([Xu et al. 2015](#)). Independientemente del método de extracción, es necesario tener en cuenta que la suspensión está sesgada hacia organismos que son fácilmente extraíbles del suelo. De hecho, la diversidad microbiana en los pocillos inoculados puede ser menor a la detectada en las muestras de suelo de origen y variar durante el período de incubación ([Smalla et al. 1998](#); [Ros et al. 2008](#)).

Las tasas de crecimiento bacteriano, y por tanto las tasas de variación del color pueden verse afectadas por la densidad del inóculo ([Garland y Mills 1991](#); [Haack et al. 1995](#); [Garland 1997](#); [Lindstrom et al. 1997](#)). Así, [Gamo y Shoji \(1999\)](#) propusieron un procedimiento de normalización que utiliza valores de densidad óptica (DO) integrados, los cuales se calculan usando valores de varias diluciones de la misma muestra. Este enfoque fue el que se aplicó en la Red de Monitoreo de Suelos de los Países Bajos ([Rutgers et al. 2016](#)).

La inoculación de las placas es un punto clave requiriendo máxima rapidez entre el llenado de los primeros pocillos y los últimos. El tiempo de transferencia del inóculo a las placas debe ser inferior a 5 minutos, o de lo contrario las tres repeticiones en una placa po-

drían mostrar diferentes resultados debido a la diferencia de tiempo de incubación ([Xu et al. 2015](#)). Una vez hecha la suspensión bacteriana y haberla inoculado en las placas, se establecen las condiciones de incubación, en oscuridad. La temperatura de incubación varía según la publicación entre los 20 °C y los 30 °C, dependiendo del objeto de estudio ([Gryta et al. 2014](#); [Xu et al. 2015](#)), llegando hasta los 37 °C en el análisis de la actividad microbiana en residuos orgánicos ([Riddech et al. 2002](#)). En la mayoría de las publicaciones no se especifica el porqué de la elección de la temperatura de incubación, pero se supone que debe ser parecida a las condiciones del lugar de muestreo para potenciar la actividad presente en este. Sin embargo, [Classen y colaboradores \(2003\)](#) estudiaron específicamente cómo afectaba la variación de la temperatura de incubación frente a una temperatura estándar de 25 °C. Los resultados mostraron un efecto significativo de la temperatura al tratar las réplicas de una misma placa por separado, sin embargo, cuando se promediaron las repeticiones dentro de la placa, esta sensibilidad a la temperatura no fue significativa. Por un lado, esto confirma la ventaja de este método al tener tres réplicas en una misma placa y valida los resultados de la mayoría de estudios que utilizan 25 °C como temperatura estándar de incubación.

Debido a la necesidad de elegir un tiempo de incubación óptimo, el cual es variable dependiendo del suelo a analizar, es necesario realizar varias medidas en el tiempo. Las medidas se hacen en lector de microplacas a una longitud de onda de 590 nm, la absorbancia máxima del colorante tetrazolio ([Garland 1997](#)). A pesar de ello, en algunos trabajos se han usado lecturas a longitudes de onda distintas, de 592 nm ([Mondini y Insam 2003](#)) a 595 nm ([Gamo y Shoji 1999](#)), e incluso a 490 nm ([Feigl et al. 2017](#)) según las limitaciones del lector de microplacas utilizado. Los valores de absorbancia medidos a tiempo 0 (poco después de la inoculación) se deben restar de las lecturas subsiguientes para eliminar el color de fondo de los sustratos y la suspensión bacteriana. En la mayoría de los estudios se realizan medidas cada 24 h durante 7 días o más ([Classen et al. 2003](#); [Floch et al. 2011](#); [Feigl et al. 2017](#)) aunque algunos trabajos intensifican las medidas durante los primeros días tomando medidas cada 12 h ([Habig y Swanepoel 2015](#)) y otros alargan la incubación y posterior lectura cada 48 h ([Ellis et al. 2001](#)). En tiempos de incubación iniciales muy cortos es probable que no se detecte desarrollo de color. Sin embargo, si el tiempo inicial de incubación se alarga se pueden alcanzar niveles de saturación en algunos pocillos. Se estima que la diversidad detectada a las pocas horas de incubación está relacionada con la microbiota funcional en el momento del muestreo, mientras que la detectada a final del ensayo incluiría la actividad de las bacterias que se han ido desarrollando durante la incubación, incluyendo aquellas que estaban en formas de resistencia inactivas en el momento de muestreo ([Xu et al. 2015](#)). La duración de los periodos de incubación/lectura puede afectar posteriormente a los resultados y la interpretación de los mismos, ya que el desarrollo del color en los pocillos individuales sigue teóricamente una curva sigmoide asintótica con el tiempo, sin embargo, algunos tienen un retraso mayor que otros ([Preston-Mafham et al. 2002](#)). Esta no linealidad tiene implicaciones importantes para la interpretación de lecturas de un tiempo fijo único (ej. 48 h), ya que los sustratos utilizados en un tiempo dado pueden no ser los mismos que en lecturas anteriores ([Garland y Mills 1991](#); [Haack et al. 1995](#)).

Análisis e interpretación de las densidades ópticas obtenidas en las lecturas

El uso de placas Biolog™ genera una gran cantidad de datos que pueden ser analizados e interpretados de múltiples maneras. Diversos trabajos se han centrado en la propuesta de distintos enfoques y técnicas estadísticas para su análisis ([Garland et al. 2001](#); [Leflaive et al. 2005](#); [San Miguel et al. 2007](#); [Weber et al. 2007](#); [Muniz et al. 2014](#); [Miki et al. 2018](#)). De hecho, existe una gran diversidad de aproximaciones analíticas para la descripción de las comunidades microbianas a partir de los resultados de DO.

Los patrones de aparición del color en las ECO-plate™ son altamente variables a causa de la variabilidad inicial en la composición de especies (Preston-Mafham et al. 2002; Stefanowicz 2006). Debido al pequeño volumen utilizado (100 µl por pocillo), el tamaño inicial de la comunidad puede ser menor a 10000 individuos/pocillo lo que podría generar variaciones al azar en la composición de especies inicial de cada pocillo. Especies escasas, pero importantes para la función de la comunidad, pueden generar color en uno sólo de los tres triplicados (Haack et al. 1995). Esto deriva en patrones de color sustancialmente diferentes entre los tres triplicados de cada placa. Los investigadores suelen usar una media de los tres triplicados, sin embargo, este valor medio puede enmascarar algunas funciones derivadas de especies escasas o sensibles a las condiciones de incubación. Por ello, es importante detectar estas variaciones entre las réplicas dentro de placa a fin de poder considerarlas a la hora de interpretar los datos o establecer el valor mínimo de DO a partir del cual se considera el uso de un sustrato como positivo.

Existen dos alternativas de análisis de los resultados claramente diferentes. La selección y análisis de los resultados de DO tras un periodo concreto de incubación (es decir, un tiempo de medición) o el análisis del perfil de desarrollo de color para cada sustrato, analizando la curva de variación de DO en el tiempo. Los análisis de ajuste de curva ayudan a estimar los parámetros logísticos (retraso, pendiente y asíntota) sobre los que se pueden realizar análisis estadísticos (Lindstrom et al. 1997) o también puede usarse el área bajo la curva cinética (Hackett y Griffiths 1997). En el caso de análisis de un tiempo de medición, se pueden calcular índices a partir de los datos globales de cada placa o en numerosos casos se acude a métodos de estadística multivariante que nos permitan considerar los resultados de cada sustrato o tipos de sustrato, a fin de analizar la estructura de la comunidad (Leflaive et al. 2005; Weber y Legge 2010).

Los índices más utilizados son: i) el valor promedio del color de los pocillos (AWCD por sus siglas en inglés, Average Well Color Development) calculado dividiendo la suma de los datos de DO por 31 (número de sustratos), ii) el número de sustratos utilizados por las comunidades bacterianas descrito como riqueza de sustratos (Rs) iii) un índice de diversidad funcional basado en el índice de biodiversidad de Shannon-Wiener, considerando la relación de la actividad catabólica de cada sustrato a la suma de todas las actividades catabólicas como el uso relativo del sustrato *i*. El punto más controvertido en estos casos es la selección del momento de lectura óptimo para el análisis. Preston-Mafham et al. (2002) consideran que, dado que el desarrollo del color en el tiempo puede variar entre pocillos, a menudo no haya un solo tiempo óptimo para la lectura de todas las placas por lo que aconseja seleccionar el tiempo de lectura para cada placa con un determinado valor de AWCD (ej. 0.5), pudiendo ser tiempos diferentes para cada placa. Por su parte, Xu et al (2015) sugieren usar al menos dos momentos de medida diferentes. Sin embargo, la mayoría de trabajos usan un único momento de incubación, siendo el mismo para todas las placas, y no siempre se justifica su elección en el texto.

El protocolo recomienda la normalización del valor de DO de cada pocillo dividiéndolo por la media de AWCD de la placa (Garland et al. 2007), para evitar los problemas derivados de la heterogeneidad en la densidad bacteriana entre pocillos. Sin embargo, el AWCD en sí mismo es un indicador ecológico de la función microbiana, por lo que la normalización puede llevar a la pérdida de información relevante (Miki et al. 2018). Por otro lado, Weber et al. (2007) aconsejan la transformación logarítmica de los datos una vez normalizados para mejorar su normalidad y homocedasticidad haciendo los datos más adecuados para el uso del análisis de componentes principales, uno de los análisis multivariantes más utilizados para diferenciar la estructura de la comunidad entre distintos suelos (Capó-Bauçà et al. 2019). Aunque existen múltiples enfoques multivariantes para el análisis (Leflaive et al. 2005; Weber y Legge 2010).

Los enfoques cinéticos tienen un gran potencial, ya que se puede obtener teóricamente una mayor información sobre el desarrollo el color de cada sustrato (Garland et al. 2001; Preston-Mafham et al. 2002). El análisis cinético permite comparar muchos aspectos diferentes de las curvas de utilización de carbono, de modo que el investigador puede ajustar el análisis para enfatizar un aspecto específico de la comunidad, como la capacidad máxima de degradación del sustrato, la rapidez de crecimiento o el tiempo necesario para alcanzar el tamaño suficiente para observar degradación del sustrato. Sin embargo, la falta general de comprensión con respecto a las bases fisiológicas o ecológicas de las diferencias en estos parámetros limita la comprensión de los resultados (Weber y Legge 2010). Garland y colaboradores (2001) encontraron que el uso de una sola lectura de DO corregida por el AWCD fue más eficaz que el uso de parámetros cinéticos para clasificar diferentes poblaciones de bacterias del suelo. El uso de parámetros cinéticos para el CLPP puede proporcionar alguna información adicional, pero solo si la influencia de la densidad inicial del inóculo se considera cuidadosamente. Por otro lado, la desviación en las lecturas de absorbancia y las respuestas no características en algunos pocillos pueden tener un gran efecto en el ajuste de la curva, haciendo que algunos datos no sean aptos para el análisis cinético (Weber y Legge 2010).

Miki y colaboradores (2018) en uno de los últimos trabajos publicados enfocados a mejorar el análisis de los resultados obtenidos con ECO-plate™, presenta formas innovadoras de analizar los datos, demostrando la importancia de la incorporación de patrones temporales durante la incubación en lugar de utilizar solo datos de un tiempo. Sus resultados también muestran que el uso de valores máximos o mínimos de DO de las tres réplicas dentro de placa, a veces da mejores resultados que el uso de los promedios. Además, en su trabajo sugiere la incorporación de información de la estructura química de los distintos sustratos para mejorar la potencia estadística, sin embargo, esto no siempre generó mejores modelos.

Conclusiones

Los microorganismos del suelo son un elemento clave para el buen funcionamiento de los agroecosistemas. Cada vez su estudio es más necesario para evaluar las técnicas agronómicas que permiten una mejor calidad del suelo. La técnica ECO-plate de Biolog™ es un método estándar, rápido, sencillo y replicable, adecuado para comparar la diversidad funcional de la comunidad de microbios del suelo bajo diferentes tratamientos o impactos, sin embargo, no parece adecuado para caracterizar a la comunidad microbiana. Como se ha mostrado en este trabajo, pequeños detalles en la implementación del protocolo de uso pueden influir en los resultados. Más aun el análisis de los resultados es un punto clave para la correcta interpretación de los mismos, siendo sin duda uno de los aspectos de mayor dificultad en su aplicación. Sería necesaria una mayor unificación del protocolo de uso de esta técnica para facilitar la comparación entre diferentes estudios. La gran variabilidad, no sólo en cuanto a los protocolos seguidos, sino también en el análisis de los resultados hace que hoy en día sea difícil sacar conclusiones generales a partir de la comparación de diversos trabajos. El uso de esta técnica probablemente continúe en aumento en los próximos años, mientras las técnicas moleculares no permitan una metagenómica funcional más asequible. Por eso recomendamos a la comunidad científica tener en cuenta las recomendaciones expresadas en la bibliografía que analiza esta técnica y mantener un protocolo óptimo y común que facilite la comparación entre estudios.

Referencias

- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. 1973. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. *Archiv für Mikrobiologie* 93(2):113-127.
- Bender, S.F., Van der Heijden, M.G. 2015. Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses. *Journal of Applied Ecology* 52(1):228-239.

- Bender, S.F., Wagg, C., Van der Heijden, M. G. 2016. An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. *Trends in Ecology and Evolution* 31(6):440-452.
- Bloem, J., Breure, A.M. 2003. Microbial indicators. En: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (eds.), *Bioindicators and Biomonitors*, pp. 259–282. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Bochner, B. 1989. "Breathprints" at the microbial level. *ASM News* 55:536-539.
- Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S., Potts, J.M. 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6):3593–3599.
- Capó-Bauçà, S., Marqués, A., Llopis-Vidal, N., Bota, J., Baraza, E. 2019. Long-term establishment of natural green cover provides agroecosystem services by improving soil quality in a Mediterranean vineyard. *Ecological Engineering* 127:285-291.
- Chapman, S.J., Campbell, C.D., Artz, R.R. 2007. Assessing CLPPs using MicroResp™. *Journal of Soils and Sediments* 7(6):406-410.
- Classen, A.T., Boyle, S.I., Haskins, K. E., Overby, S.T., Hart, S.C. 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. *FEMS Microbiology Ecology* 44(3):319-328.
- Dan, W., Qian, Y., Zhang, J.Z., Shuang, W. A. N. G., Xue-Li, C.H.E.N., Zhang, X. L., Wei-Qun, L.I. 2008. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization. *Pedosphere* 18(5):582-592.
- Degens, B.P., Harris, J.A. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 29(9-10):1309–1320.
- Dong, X.U.E., Huai-Ying, Y.A.O., De-Yong, G.E., Huang, C.Y. 2008. Soil microbial community structure in diverse land use systems: a comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses. *Pedosphere* 18(5), 653-663.
- Ellis, R.J., Neish, B., Trett, M.W., Best, J.G., Weightman, A.J., Morgan, P., Fry, J.C. 2001. Comparison of microbial and mesofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. *Journal of Microbiological Methods* 45(3):171-185.
- Feigl, V., Ujaczki, É., Vaszi, E., Molnár, M. 2017. Influence of red mud on soil microbial communities: Application and comprehensive evaluation of the Biolog EcoPlate approach as a tool in soil microbiological studies. *Science of the Total Environment* 595:903-911.
- Floch, C., Chevremont, A.C., Joanico, K., Capowiez, Y., Criquet, S. 2011. Indicators of pesticide contamination: soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *European Journal of Soil Biology* 47(4):256-263.
- Gamo, M., Shoji, T. 1999. A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses Biolog plates and multiple sole carbon sources. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10):4419-4424.
- Garland, J.L., Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8):2351-2359.
- Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 24:289–300.
- Garland, J.L., Mills, A. L., Young, J.S. 2001. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology and Biochemistry* 33(7-8):1059-1066.
- Garland, J.L., Roberts, M.S., Levine, L.H., Mills, A.L. 2003. Community-level physiological profiling performed with an oxygen-sensitive fluorophore in a microtiter plate. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5):2994-2998.
- Garland, J.L., Campbell, C.D., Mills, A.L. 2007. Physiological profiling of microbial communities. En: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A. (eds.), *Manual of Environmental Microbiology* (Third Edition), pp. 126-138. American Society of Microbiology, Washington, DC, Estados Unidos.
- Gillespie, D.E., Brady, S.F., Bettermann, A.D., Cianciotto, N.P., Liles, M.R., Rondon, M.R., Clardy, J., Goodman, R.M., Handelsman, J. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9):4301-4306.
- Gryta, A., Frąc, M., Oszust, K. 2014. The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174(4):1434-1443.
- Haack, S.K., Garchow, H., Klug, M.J., Forney, L.J. 1995. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1458-1468.
- Habig, J., Swanepoel, C. 2015. Effects of conservation agriculture and fertilization on soil microbial diversity and activity. *Environments* 2(3):358-384.
- Hackett, C.A., Griffiths, B.S. 1997. Statistical analysis of the time-course of Biolog substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods* 30(1):63-69.
- Hazen T.C., Rocha A.M., Techtman S.M. 2013. Advances in monitoring environmental microbes. *Current Opinion in Biotechnology* 24:526–533
- Hedrick D.B., Peacock A.D., White D.C. 2007. Lipid analyses for variable microbial biomass, community composition, metabolic status, and in situ metabolism. En: Hurst, C.J. (editor-in-chief), *Manual of Environmental Microbiology* (3rd edition), pp. 112-125. American Society Microbiology Press, Washington DC, Estados Unidos.
- Jacobsen, C.S., Hjelmsø, M.H. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 27:15-20.
- Kelly, J., Tate, R.L. 1998. Use of Biolog for the analysis of microbial communities from zinc-contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 27(3):600
- Leflaive, J., Céréghino, R., Danger, M., Lacroix, G., Ten-Hage, L. 2005. Assessment of self-organizing maps to analyze sole-carbon source utilization profiles. *Journal of Microbiological Methods* 62(1):89-102.
- Lindstrom, J.E., Barry, R.P., Braddock, J.F. 1997. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry* 30(2):231- 329.
- Liu, W.T, Stahl, D.A. 2007. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. En: Hurst, C.J. (editor-in-chief) *Manual of Environmental Microbiology* 3rd edition, pp. 139-156. American Society Microbiology Press, Washington DC, Estados Unidos.
- McLamore, E.S., Garland, J.L., Mackowiak, C., Desaunay, A., Garlanda, N., Chaturvedi, P., Taguchi, M., Dreaden, K., Catechis, J., Ullman, J.L. 2014. Development and validation of an open source O₂-sensitive gel for physiological profiling of soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 96:62–67.
- Miki, T., Yokokawa, T., Ke, P.J., Hsieh, I.F., Hsieh, C.H., Kume, T., Yoneya K., Matsui, K. 2018. Statistical recipe for quantifying microbial functional diversity from EcoPlate metabolic profiling. *Ecological Research* 33(1):249-260.
- Mondini, C., Insam, H. 2003. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *European Journal of Soil Biology* 39(3):141-148.
- Mulder, C., Wouterse, M., Raubuch, M., Roelofs, W., Rutgers, M. 2006. Can transgenic maize affect soil microbial communities?. *PLoS Computational Biology* 2(9):e128.
- Muniz, S., Lacarta, J., Pata, M.P., Jimenez, J.J., Navarro, E. 2014. Analysis of the diversity of substrate utilization of soil bacteria exposed to Cd and earthworm activity using generalised additive models. *PLoS One* 9(1), e85057.
- Ngara T.R., Zhang H. 2018. Recent advances in function-based metagenomic screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16:405–415
- Nair, A., Nguoujio, M. 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Applied Soil Ecology* 58:45-55.
- O'Donnell, A.G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J.T. 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil* 232(1-2):135-145.
- Oren, A., Steinberger, Y. 2008. Coping with artifacts induced by CaCO₃-CO₂-H₂O equilibria in substrate utilization profiling of calcareous soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40(10):2569–2577.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles: a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42(1):1-14.

- Renault, P., Ben-Sassi, M., Bérard, A. 2013. Improving the MicroResp™ substrate-induced respiration method by a more complete description of CO₂ behavior in closed incubation wells. *Geoderma* 207-208:82-91.
- Riddech, N., Klammer, S., Insam, H. 2002. Characterisation of microbial communities during composting of organic wastes. En: Insam, H., Riddech, N., Klammer, S. (eds.), *Microbiology of composting*, pp. 43-51. Springer, Berlin, Heidelberg, Alemania.
- Ros, M., Goberna, M., Pascual, J.A., Klammer, S., Insam, H. 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *Journal of Microbiological Methods* 72(3):221-226.
- Rowell, M.J. 1995. Colorimetric method for CO₂ in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):373-375.
- Rutgers, M., Breure, A.M., Insam, H. 2006. Substrate utilization in Biolog™ plates for analysis of CLPP. En: Bloem, J., Hopkins, D. W., Benedetti, A. (eds.), *Microbiological methods for assessing soil quality*, pp. 212-227. CABI Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido.
- Rutgers, M., Wouterse, M., Drost, S.M., Breure, A.M., Mulder, C., Stone, D., Creamer, R.E., Windige, A., Bloem, J. 2016. Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog™ ECO-plates in the Netherlands and Europe. *Applied Soil Ecology* 97:23-35.
- San Miguel, C., Dulinski, M., Tate, R. L. 2007. Direct comparison of individual substrate utilization from a CLPP study: a new analysis for metabolic diversity data. *Soil Biology and Biochemistry* 39(8), 1870-1877.
- Shishido, M., Chanway, C.P. 1998. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficiency. *Soil Biology and Biochemistry* 30(7):939-947.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.T., Forney, L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4):1220-1225.
- Srivastava, V., Sarkar, A., Singh, S., Singh, P., de Araujo, A.S., Singh, R.P. 2017. Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances. *Frontiers in Environmental Science* 5:64.
- Stefanowicz, A. 2006. The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(5):669-676.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56(3):782-787.
- Van Eekeren, N., Bommelé, L., Bloem, J., Schouten, T., Rutgers, M., de Goede, R., Reheul, D., Brussaard, L. 2008. Soil biological quality after 36 years of ley-arable cropping, permanent grassland and permanent arable cropping. *Applied Soil Ecology* 40(3):432-446.
- Van der Heijden, M.G., Bardgett, R. D., Van Straalen, N.M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11(3):296-310.
- Weber, K.P., Grove, J.A., Gehder, M., Anderson, W.A., Legge, R.L. 2007. Data transformations in the analysis of community-level substrate utilization data from microplates. *Journal of Microbiological Methods* 69(3):461-469.
- Weber, K.P., Legge, R.L. 2010. Community-level physiological profiling. En: Cummings, S.P. (ed.), *Bioremediation*, pp. 263-281. Humana Press, Springer Nature, Suiza.
- Wei, M., Tan, F., Zhu, H., Cheng, K., Wu, X., Wang, J., Zhao, K., Tang, X. 2012. Impact of Bt-transgenic rice (SHK601) on soil ecosystems in the rhizosphere during crop development. *Plant Soil and Environment* 58(5):217-223.
- Wu L., Thompson D.K., Li G., Hurt R.A., Tiedje J.M., Zhou J. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5780-5790.
- Xu, W., Ge, Z., Poudel, D.R. 2015. Application and optimization of Biolog ECO-plates in functional diversity studies of soil microbial communities. *MATEC Web of Conferences* 22:4015.
- Yang, C.M., Wang, Y.L., Wang, M.M., Chen, H.Y. 2013. Plant species influence microbial metabolic activity and butachlor biodegradation in a riparian soil from Chongming Island, China. *Geoderma* 193-194:165-171.
- Zabaloy, M.C., Lehman, R.M., Frey, S.D., Garland, J.L. 2008. Optimization of an oxygen-based approach for community-level physiological profiling of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40(12):2960-2969.