

Efectos del uso agropecuario sobre las comunidades de lombrices y el rol de éstas en la formación de materia orgánica del suelo

MSc. Andrés Ligrone Ciganda

TESIS presentada como requisito para obtener el
título de Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

PEDECIBA - Biología

Facultad de Ciencias

Orientador: Dr. Gervasio Piñeiro

Co-orientadora: Dra. Gabriella Jorge-Escudero

Montevideo

Uruguay

2024

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Estela Santos, el Dr. Fernando Momo y la Dra. Elena Velásquez, el 13 de diciembre de 2024.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento enormemente a quienes de muchas formas aportaron a este trabajo:

- A las familias y gestores de los predios muestreados
- Máximo Alvarez
- Voluntarias/os: Sabina, Valentina, Leandro, Pablo, Lu y muchas personas más que hicieron posible los muestreos de campo
- Rodrigo Arana
- Fabricio Tiscornia
- Al Museo Nacional de Historia Natural, particularmente a Fabricio Scarabino, Sebastián Wilson Serra y Sabina Wlodek
- Andrea Rodríguez, Matías Giménez y Andreas Hein
- Santiago Arana
- Equipo de Gervasio Piñeiro por muchos intercambios y aportes & IFEVA (UBA) por recibirme varias veces
- Paula Berenstecher
- Juan Manuel Piñeiro
- Agustín Laguarda
- EEFA (Facultad de Agronomía)
- Bruno Bazzoni (hospedero en BsAs & aportes varios)
- Improbables
- Funcionarios de Facultad de Agronomía
- Dpto. de Suelos y Dpto. de Sistemas Ambientales de Facultad de Agronomía
- Laboratorio de suelo de Facultad de Agronomía, particularmente a Carlos y Marcelo
- George Brown, Sam James, Marie Bartz
- Felipe Lezama
- La Casita
- Con muchísimo amor, a mi Familia y a Lu
- A la CAS (Estela Santos, Lucía Salvo y Camilo Bedano) y el tribunal
- A mis orientadores, Gervasio Piñeiro y Gabriella Jorge-Escudero
- A las instituciones financiadoras (ANII, CAP)
- A PEDECIBA

Contenido

RESUMEN	4
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
AGRICULTURA Y LOMBRICES EN URUGUAY	9
Objetivo general de la tesis.....	12
Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO 2. SEASONAL DYNAMICS OF AGRICULTURAL LAND USE IMPACTS ON EARTHWORM COMMUNITIES: INSIGHTS INTO DIVERSITY, ABUNDANCE, AND FUNCTIONAL COMPOSITION ...	13
CAPÍTULO 3. LAS LOMBRICES FAVORECEN LA FORMACIÓN Y PRESERVACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO EN DIFERENTES FRACCIONES DEL SUELO SEGÚN SUS HÁBITOS ALIMENTICIOS Y LA CALIDAD Y UBICACIÓN DEL RESIDUO VEGETAL PRESENTE.....	23
INTRODUCCIÓN.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS	26
ETAPA DE CULTIVO Y ENRIQUECIMIENTO CON ¹³ C DE LAS PLANTAS EN INVERNÁCULO	26
ETAPA DE ADICIÓN DE LOMBRICES E INCUBACIÓN.....	28
MICROCOSMOS EX-SITU	30
MUESTREOS Y ANÁLISIS ISOTÓPICOS DE SUELO Y PLANTAS.....	30
CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES.....	46
ANEXO (CAPITULO 3).....	47
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL	50
PERSPECTIVAS A FUTURO	59
CONCLUSIONES GENERALES.....	60
BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

Las lombrices tienen un enorme potencial de incidir en la estructura y funcionamiento del suelo, particularmente en la dinámica del carbono orgánico del suelo (COS), clave para la integridad ecológica y salud del suelo en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Afectan estos procesos mediante mecanismos como la protección o desprotección del COS o C vegetal en micro y macroagregados y su estabilización o mineralización mediante la alteración de la comunidad microbiana. A su vez, las diferentes fracciones del suelo pueden presentar respuestas diferentes a la acción de las lombrices. La materia orgánica particulada (POM) y la materia orgánica asociada a minerales (MAOM), de mayor y menor biodisponibilidad y velocidad de ciclado, respectivamente, son fracciones cada vez más utilizadas en el estudio de la dinámica del COS. Por otro lado, las actividades productivas agropecuarias usualmente alteran de forma notoria la biota del suelo. Dado que las propiedades del suelo que parecen determinar en mayor medida las características de las comunidades de lombrices son la humedad del suelo, la textura, profundidad, pH y contenido de materia orgánica, se espera que las prácticas productivas que alteren directa o indirectamente estas propiedades induzcan cambios notorios sobre las comunidades de lombrices. A pesar de la relevancia de estas interacciones, los aspectos cuantitativos y cualitativos de su actividad sobre la dinámica del COS y de los efectos de las prácticas productivas son aún poco comprendidos. En este sentido, los objetivos de este trabajo fueron 1) evaluar los efectos del uso agrícola del suelo sobre la abundancia, biomasa y composición taxonómica y funcional de las comunidades de lombrices, y 2) cuantificar la influencia de dos especies de lombrices de hábitos de vida distintos, una lombriz endógea y una anécica, sobre la tasa de incorporación de carbono al suelo desde residuos vegetales de una gramínea y una leguminosa. La metodología para el objetivo 1 se basó en relevamientos de las comunidades de lombrices y las características fisicoquímicas del suelo en parcelas contiguas (mismo tipo de suelo) de campo natural bajo pastoreo y rotaciones agrícolas intensivas en 7 establecimientos agropecuarios en Uruguay, con frecuencia estacional entre las primaveras de 2020 y 2021. Para el objetivo 2 se llevó a cabo un experimento en ambiente controlado en el que se rastreó la dinámica del COS y C vegetal a la POM y MAOM del suelo mediante marcado isotópico en microcosmos durante 40 días, en presencia de ejemplares de *Aporrectodea caliginosa* (lombriz endógea geófaga) o *Lumbricus friendi* (anécica saprófaga) y residuos de las especies de interés agronómico *Vicia villosa* (leguminosa) o *Avena strigosa* (gramínea). Respecto al objetivo 1, los resultados revelaron un claro impacto negativo de los cultivos sobre las comunidades de lombrices de tierra, registrándose reducciones

sustanciales en su biomasa, densidad y tamaño corporal medio. Se identificaron varias propiedades fisicoquímicas del suelo como posibles mediadoras de estos efectos, principalmente el régimen hídrico del suelo y el contenido de materia orgánica. Estas diferencias se atribuyeron a filtros ambientales que limitan la presencia de especies exóticas de lombrices de mayor tamaño en los cultivos. Además, la dinámica temporal mostró que las diferencias entre usos del suelo fueron más pronunciadas durante otoño e invierno. Estos impactos resultaron en una reducción de la diversidad funcional, lo que se espera que disminuya la capacidad de las lombrices para actuar como bioingenieros, con importantes consecuencias para la estructura y el funcionamiento del suelo. Respecto al objetivo 2, la lombriz geófaga mostró una capacidad significativamente mayor para incorporar C desde los residuos vegetales y reducir la pérdida de C original en presencia de biomasa vegetal de alta calidad (vicia). Sin embargo, con biomasa de baja calidad (avena), solo la lombriz saprófaga aumentó la incorporación de C. Los resultados muestran cómo los hábitos alimenticios de las lombrices definen su impacto en la dinámica del carbono en el suelo, en base a dos mecanismos no excluyentes: incorporación de C nuevo (asociado a ambas lombrices) y mantenimiento de C original de MAOM y C nuevo (asociado a la especie geófaga). Estos mecanismos están, a su vez, asociados al tipo y ubicación del tejido vegetal en el que se origina el C nuevo incorporado. En este sentido, observamos que el aumento de incorporación de C nuevo originado en raíz, dado por la lombriz geófaga, proviene principalmente de la rizodeposición y no del tejido macroscópico de raíz. Esta observación, no documentada hasta el momento según nuestro conocimiento, trae importantes implicancias ecológicas, agronómicas (en términos de interacción con diferentes cultivos de servicio) y metodológicas (i.e. los experimentos de este tipo que no incluyen la rizodeposición en su diseño pueden estar subestimando en gran medida el efecto de las lombrices). En conclusión, este trabajo aporta a la comprensión de la interacción entre los rasgos funcionales de las lombrices y de las plantas en la dinámica del COS y de los efectos del uso del suelo sobre las lombrices. Es necesario fortalecer la investigación en estas líneas para dilucidar mejor los mecanismos que impulsan estos patrones, fortaleciendo el desarrollo de enfoques de producción sustentable y conservación de la biodiversidad más efectivos.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los organismos de la fauna del suelo, y particularmente el grupo de las lombrices de tierra, juegan un rol clave en la sustentabilidad de los agroecosistemas. Inciden directa e indirectamente sobre variables ecosistémicas como la capacidad de infiltración de agua, incorporación de carbono en diferentes formas y estabilidad, y el metabolismo general del suelo, hasta la pedogénesis y la meteorización e incorporación de nutrientes desde el material parental (Lavelle et al., 2006). Las lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) usualmente representan la mayor parte de la biomasa de fauna del suelo, y son particularmente relevantes debido a su rol como bioingenieros afectando el funcionamiento y la estructura del suelo (Blouin et al., 2013; Lavelle et al., 2006). A través de su actividad inciden de forma extraordinaria en procesos centrales para la producción agropecuaria, logrando e.g. aumentos promedio del 100% en las tasas de descomposición de residuos vegetales (W. Huang et al., 2020), aumentos de 33% en mineralización del carbono (Lubbers et al., 2013). Sus efectos se expresan a nivel productivo, e.g. en aumentos promedio de ca. 25% en la producción primaria aérea y subterránea (van Groenigen et al., 2015), y contribuyendo en más de 6% a la producción global de granos (Fonte et al., 2023).

Las lombrices de tierra pueden afectar la estructura, composición y procesos ecosistémicos mediante diversos mecanismos. Estos mecanismos incluyen aumentos en la infiltración y retención de agua (Hallam et al., 2020; Hallam & Hodson, 2020), mejoras en la agregación del suelo (Blanchart et al., 1990; Bossuyt et al., 2006), la aireación, compactación o descompactación a través de la generación de estructuras biogénicas (Alegre et al., 1996; Blanchart et al., 1999) y aumentos en la disponibilidad de nutrientes para las plantas por transporte de materia a diferentes profundidades e incorporación de carbono al suelo (Blouin et al., 2013). Además, inciden sobre la abundancia y distribución espacial de organismos que interactúan con las plantas, e.g. por predación sobre hongos patógenos de raíces (Jorge-Escudero et al., 2021), sobre la comunidad de nemátodos (Boyer et al., 2013), y sobre el funcionamiento de las comunidades de microorganismos (Binet et al., 1998; Hoang et al., 2016). Así, muchos de sus efectos dependen de la su acción directa sobre el suelo, mientras que otros son mediados por su influencia sobre la comunidad de microorganismos (e.g. en términos de composición, estructura espacial, abundancia y funcionamiento), la cual determina en gran medida el funcionamiento del ecosistema (Blouin et al., 2013; Lavelle & Spain, 2002). A su vez, estos efectos dependen de sus hábitos de vida. La clasificación en grupos ecológicos de Bouché (1977) los separa en: endogeas (de hábitos subterráneos,

construcción de galerías semi permanentes y alimentación geófaga), anécicas (construyen galerías permanentes por las que acceden a la superficie periódicamente, de hábitos saprófagos basados en residuos vegetales), epigeas (habitan la hojarasca en la superficie del suelo, también de hábitos saprófagos) y categorías intermedias.

La influencia de las lombrices sobre el ciclo del carbono es sustancial y central para comprender el flujo de la energía de los ecosistemas y su sustentabilidad a largo plazo. El carbono orgánico del suelo (COS) es un atributo clave de los ecosistemas, del cual dependen diversos factores como la dinámica de los nutrientes, la energía disponible para el funcionamiento de la comunidad de heterótrofos subterráneos y superficiales, la capacidad de retención de agua y la resistencia a la erosión, entre otros. Las lombrices influyen sobre los contenidos de COS mediante varios mecanismos, ya que afectan tanto la tasa de descomposición de los residuos orgánicos (broza) como la incorporación de carbono al suelo (W. Huang et al., 2020; Zhang et al., 2013), a través de cambios en la calidad y en la distribución espacial de los residuos orgánicos (Bossuyt et al., 2006).

Sin embargo, existen evidencias contradictorias en cuanto a si la actividad de las lombrices aumenta o disminuye los contenidos de COS (Angst et al., 2024; W. Huang et al., 2020; Thomas et al., 2020). A pesar de la complejidad de las condicionantes ambientales y biofísicoquímicas de este efecto, se ha sugerido que es importante considerar las respuestas diferenciales de las fracciones del suelo (Sánchez-de León et al. 2014; Bossuyt et al. 2006; Bossuyt et al. 2004). En particular, las fracciones de materia orgánica particulada (POM, por sus siglas en inglés) y materia orgánica asociada a minerales (MAOM, por sus siglas en inglés) presentan dinámicas del carbono marcadamente diferentes (Jackson et al., 2017; Lavalley et al., 2019). La POM se compone principalmente de fragmentos de plantas (mayores a 53 micras) con poca o nula descomposición, contiene compuestos complejos, poco asimilables por plantas o microorganismos y un tiempo medio de residencia de años o décadas (Cambardella & Elliott, 1992; Lavalley et al., 2019). La MAOM, en cambio, se compone de moléculas de bajo peso molecular o fragmentos microscópicos (menores a 53 micras) de material orgánico originados por lixiviado o transformación química por la biota del suelo, los cuales se encuentran en íntima asociación con los minerales del suelo (principalmente arcilla) y presenta tiempos medios de residencia de décadas a siglos (Cambardella & Elliott, 1992; Lavalley et al., 2019). La acción de las lombrices podría influir de forma significativa sobre la eficiencia de formación¹ de estas fracciones de materia orgánica, por lo que conocer estos efectos es particularmente

¹ Proceso conocido usualmente como humificación, aunque el término ha sido cuestionado recientemente (Schmidt et al., 2011).

relevante para entender su rol sobre la estabilización del carbono en el suelo (Bossuyt et al., 2004, 2006; Jackson et al., 2017). Estos efectos dependen, entre otras, del rol funcional de las especies de lombrices (e.g. hábitos alimenticios) y de la calidad y cantidad de los residuos vegetales aportados al suelo (e.g. relación C:N; Bossuyt et al., 2006; Buck et al., 1999; Sánchez-de León et al., 2014).

En esta línea, las técnicas de enriquecimiento isotópico de tejidos vegetales (e.g. con ^{13}C y ^{15}N) ofrecen la oportunidad de observar de forma diferencial el flujo del C y N proveniente de diferentes fuentes (materia orgánica, tejidos vegetales aéreos o radiculares) y hacia las diferentes fracciones (POM y MAOM). Estas técnicas, innovadoras en esta área, están siendo cada vez más utilizadas para lograr trazar el movimiento del C en el suelo, incluso bajo la influencia de las lombrices (Bossuyt et al., 2006; Putz et al., 2011; Vidal et al., 2017; Zhang et al., 2013). A su vez, otro aspecto metodológico que resulta particularmente interesante y potencialmente importante a ser considerado es el modo en el que se adicionan los residuos vegetales a los suelos. La gran mayoría de los experimentos en microcosmos diseñados para medir el efecto de la presencia de lombrices sobre el flujo del C agregan residuos vegetales a los microcosmos (e.g. recipientes con suelo y con o sin lombrices) en modo “ex-situ”, o sea, plantas que fueron cultivadas en otro medio y luego son retirados de su lugar de cultivo y agregadas al suelo del microcosmos experimental. En estos diseños experimentales no se considera al C (y otros compuestos) provenientes de la rizodeposición de las plantas, componente altamente relevante para el flujo del C hacia el suelo, especialmente hacia la MAOM (Berenstecher et al., 2023; Cotrufo et al., 2015; Sokol & Bradford, 2019; Villarino et al., 2021). Es así como un diseño experimental en donde las plantas sean cultivadas “in situ” en los mismos microcosmos en donde luego se incorporan las lombrices, considerará los efectos de la rizosfera y la rizodeposición en la formación de COS por parte de las lombrices. Estos microcosmos tienen el potencial de aportar observaciones particularmente novedosas y relevantes para la comprensión de los efectos de las lombrices sobre el flujo del COS. Una técnica de enriquecimiento con ^{13}C adecuada para un diseño de este tipo es la descrita por Putz et al. (2011) y Berenstecher et al. (2023).

La relación C:N de los tejidos vegetales tiene demostrada influencia sobre la actividad de alimentación de las lombrices (Buck et al., 1999; Curry & Schmidt, 2007; Euteneuer et al., 2020), los procesos de descomposición, la dinámica del C en la red trófica del suelo y su destino hacia las diferentes fracciones de la materia orgánica del suelo (MOS) (Buck et al., 1999; W. Huang et al., 2020; Lavalley et al., 2019). Por ello, la utilización de especies contrastantes en su C/N, como las leguminosas y gramíneas, aporta una mirada

complementaria del efecto de las lombrices sobre el destino del C a la MOS desde tejidos vegetales de calidad contrastante. A su vez, la discriminación entre tejidos de parte aérea y de raíz permite mejorar nuestra comprensión del mecanismo detrás de la formación y estabilización del COS a partir de distintos sustratos. Por ejemplo, sería interesante comprender la importancia relativa del aporte de distintas calidades de tejidos aéreos (rastrojo) o subterráneos (raíces) en la eficiencia de formación de C a la MOS con alta o baja abundancia de lombrices.

AGRICULTURA Y LOMBRICES EN URUGUAY

En Uruguay, luego de los esfuerzos de colecta y descripción de especies realizados por Ergasto Cordero hasta la década de 1940 (Cordero, 1930, 1931, 1942, 1943b, 1943a, 1944c, 1944b, 1944a, 1945), el estudio de las lombrices fue retomado recién medio siglo después con los trabajos de Grosso et al. (2006) y Zerbino (e.g. Zerbino & Morón, 2003). Partiendo de los antecedentes hasta ese momento centrados en la composición taxonómica y distribución geográfica (sintetizados en Grosso & Brown, (2007), estos nuevos esfuerzos de principios del siglo XXI exploraron las interacciones entre las comunidades de lombrices y el manejo productivo agropecuario en diversos agroecosistemas del país. Los trabajos de Zerbino y más recientemente de Jorge-Escudero, incluyen la dimensión ambiental y ecológica de forma más explícita y analítica, incorporando análisis de las relaciones entre las variables fisicoquímicas del suelo y las principales características de las comunidades de lombrices. Estos trabajos, constituyen una contribución clave y pionera a nivel nacional, estableciendo un punto de partida para mejorar nuestra comprensión de la respuesta de las comunidades de lombrices al uso agropecuario.

Las actividades productivas agropecuarias usualmente alteran de forma evidente la biota del suelo (Lagerlöf et al., 2012). A través de cambios físicos, químicos y biológicos, la ganadería y la agricultura modifican las condiciones ambientales del suelo y, con esto, la composición, estructura y funcionamiento de las comunidades de fauna y flora (Lavelle & Spain, 2002). Dado que las propiedades del suelo que parecen determinar en mayor medida las características de las comunidades de lombrices son la humedad del suelo, la textura, la profundidad, el pH y el contenido de materia orgánica (Curry, 2004), se espera que las prácticas productivas que alteren directa o indirectamente estas propiedades induzcan cambios notorios sobre las comunidades de lombrices (Piñeiro et al., 2009; Zerbino, 2007). A pesar de la relevancia de estas interacciones y el creciente conocimiento disponible (Phillips et al., 2021), los aspectos

cualitativos y cuantitativos de los efectos de las prácticas productivas son aún poco comprendidos.

Los trabajos previos realizados en Uruguay muestran que la densidad de lombrices varía de manera importante con el uso agropecuario, pero esta respuesta es muchas veces contradictoria (M. Alvarez et al., 2024; Grosso et al., 2006; Jorge-Escudero et al., 2024; Zerbino, 2007, 2010, 2011, 2012; Zerbino & Morón, 2003). En estos trabajos, las densidades de lombrices son, en promedio, similares entre el campo natural y el uso agropecuario (de 149 y 153 ind/m², respectivamente). A su vez, la biomasa, generalmente menos reportada, también es similar en campo natural y bajo agricultura (25 y 21 g/m², respectivamente), tomando el conjunto de estos registros (M. Alvarez et al., 2024, 2024; Zerbino, 2007, 2011). Sin embargo, estos trabajos individualmente reportan a veces incrementos o reducciones en la densidad o biomasa de lombrices con el uso agrícola, en comparación al campo natural. A su vez, los muestreos se han realizado generalmente en una estación (por ejemplo, el otoño) y debido a la alta estacionalidad en el aporte de residuos de la agricultura, sería necesario realizar muestreos en distintos momentos del año. Por otro lado, se considera que aún existe un vacío importante de información a nivel territorial, con pocas localidades muestreadas en el país (Fig. 1).

Finalmente, con 25 especies reportadas hasta ahora (M. Alvarez et al., 2024, 2024; Grosso & Brown, 2007), la diversidad de lombrices en nuestro país parece estar subestimada en gran medida. Este número es algo menor al reportado en las regiones contiguas de Argentina (26 especies en Buenos Aires, Entre Ríos y Misiones; Sanabria et al., 2023) y Brasil (78 especies en Rio Grande do Sul; Ferreira et al., 2023), pero el país cuenta con un esfuerzo de muestreo mucho menor al de estas regiones. A nivel nacional el listado de especies crece en cada nuevo esfuerzo significativo de muestreo (M. Alvarez et al., 2024; Jorge Escudero et al., 2019; Jorge-Escudero et al., 2024), sugiriendo que aún desconocemos una parte importante de esta diversidad.

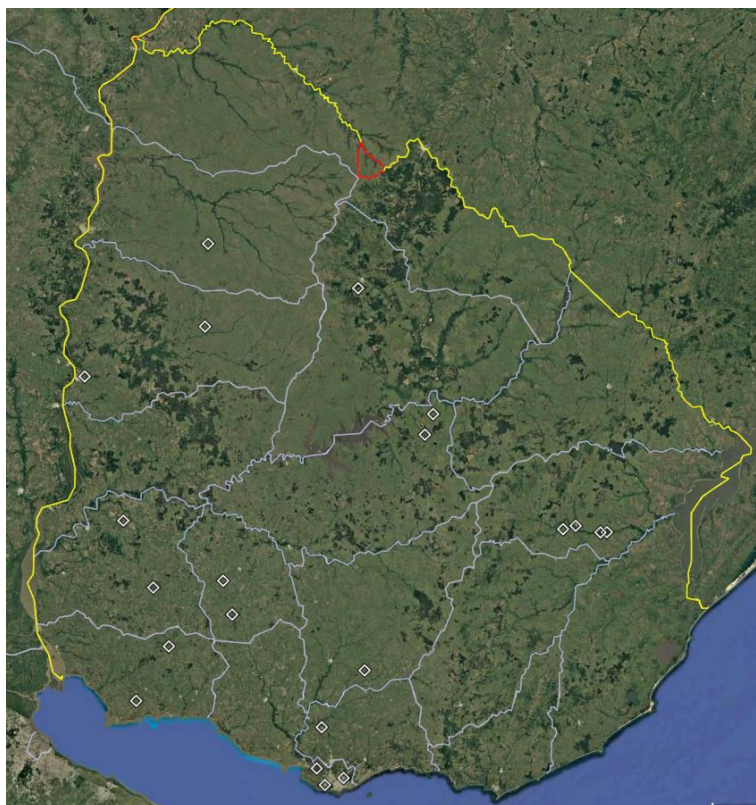


Figura 1. Sitios muestreados en Uruguay hasta el presente, cuya publicación incluye estimaciones de abundancia y/o biomasa de lombrices en agroecosistemas.

En vistas de la relevancia ecosistémica de estos organismos, el desconocimiento de los efectos del uso agropecuario sobre las comunidades de lombrices (y la biota del suelo en general) limita en gran medida el avance sobre dos de los principales desafíos en torno a la producción agropecuaria a nivel nacional y global: i) la evaluación de los impactos de estas actividades sobre la biodiversidad y servicios ecosistémicos y ii) el diseño e implementación de prácticas agropecuarias más sostenibles (FAO et al., 2020). El fortalecimiento del uso sustentable del suelo requiere incorporar a la gestión de los agroecosistemas las dinámicas de la biota del suelo, sus respuestas a los cambios en el ambiente (impactos del uso del suelo sobre la biota) y sus efectos sobre el funcionamiento y la estructura de los agroecosistemas, afectando a su vez la provisión de servicios ecosistémicos (FAO et al., 2020; Lavelle et al., 2006). En este sentido, en nuestro país el entendimiento de estas relaciones entre biota del suelo y los usos agropecuarios sigue aún en etapas muy iniciales y requiere ser profundizado para mejorar el aporte a la teoría ecológica y al manejo agropecuario más sustentable.

Objetivo general de la tesis

Comprender los efectos del uso agropecuario del suelo sobre las comunidades de lombrices de tierra en Uruguay, y evaluar los mecanismos por los cuales lombrices con distintos hábitos alimenticios afectan la formación de la materia orgánica del suelo en distintas fracciones, a partir de residuos vegetales de calidades contrastantes.

Objetivos específicos

El objetivo específico 1, que será abordado en el Capítulo 2 de esta tesis, es evaluar los efectos del uso agrícola del suelo sobre la abundancia, biomasa y composición taxonómica y funcional de las comunidades de lombrices. Se plantea como hipótesis que los cambios de las condiciones biofísicoquímicas del suelo, dadas por diferentes manejos agropecuarios, alteran estas características de las comunidades de lombrices. La aproximación metodológica consistió en relevamientos de las comunidades de lombrices y las características físicoquímicas del suelo en parcelas contiguas de campo natural bajo pastoreo y rotaciones agrícolas intensivas en diferentes establecimientos agropecuarios en Uruguay, con frecuencia estacional entre las primaveras de 2020 y 2021.

El objetivo específico 2, que será abordado en el Capítulo 3 de esta tesis, es cuantificar la influencia de dos especies de lombrices de hábitos de vida distintos, una lombriz endógea geófaga (*Aporrectodea caliginosa*) y una anécica saprófaga (*Lumbricus friendi*), sobre la tasa de incorporación de carbono al suelo desde residuos vegetales de una gramínea (*Avena strigosa*) y una leguminosa (*Vicia villosa*). Se plantea como hipótesis que la actividad de las lombrices altera la tasa de incorporación de carbono al suelo desde los residuos vegetales, y que estos efectos difieren entre especies de lombrices, tipo y ubicación del tejido vegetal y entre las fracciones del suelo (i.e. POM y MAOM). La aproximación metodológica consistió en determinar la cantidad del carbono incorporado a estas fracciones del suelo mediante un ensayo en macetas y ambiente controlado, con tratamientos que combinan la presencia de estas especies de lombrices y plantas, utilizando marcadores isotópicos (^{13}C) aplicados a las plantas para estimar la incorporación y estabilización del C en el suelo.

CAPÍTULO 2. SEASONAL DYNAMICS OF AGRICULTURAL LAND USE IMPACTS ON EARTHWORM COMMUNITIES: INSIGHTS INTO DIVERSITY, ABUNDANCE, AND FUNCTIONAL COMPOSITION



Original article

Seasonal dynamics of agricultural land use impacts on earthworm communities: Insights into diversity, abundance, and functional composition

Andrés Ligrone^{a,*}, Máximo Alvarez^b, Gabriella Jorge-Escudero^a, Gervasio Piñeiro^c

^a Departamento de Sistemas Ambientales, Facultad de Agronomía, Universidad de La República, Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, Universidad de La República, Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay

^c Cátedra de Ecología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires., Argentina. Av. San Martín 4453, C1417DSE, Buenos Aires, Argentina



ARTICLE INFO

Handling editor: Hoeffner Kevin

Keywords:

Land-use impacts
Oligochaeta
Soil macrofauna
Agroecosystems
Functional traits
Temporal dynamics

ABSTRACT

Earthworms play a key role as soil bioengineers, but livestock farming and croplands can impact on the composition, structure, and functioning of earthworm communities. This study aimed to quantify the effects of replacing natural grasslands with crop rotations on the seasonal dynamics of key attributes of earthworm communities and explore soil physicochemical properties as mechanisms behind these effects. We conducted paired samplings on seven sites across Uruguay, comparing earthworm communities in soils under grazed natural grasslands and adjacent croplands, considering earthworm species composition, richness, diversity, and evenness, biomass, density, and mean body weight, over five consecutive seasons. Results revealed a clear negative impact of croplands on earthworm communities, showing substantial reductions in all considered attributes. Observed changes were attributed to environmental filters limiting the occurrence of larger exotic earthworm species in croplands, and variations in soil physicochemical properties were identified as potentially mediating some of these effects, including soil water regime (particularly affecting juvenile individuals) and soil organic matter content. These impacts resulted in a shift to dominance of *r* strategists (smaller, surface-feeding species such as *Microcolex* spp. in croplands compared to larger deeper-burrowing species in grasslands) and reduced functional composition of earthworm communities. Furthermore, seasonal dynamics revealed that differences between land uses were more pronounced during wetter periods, underscoring the relevance of seasonal variations when evaluating land use impacts on earthworm communities. Earthworms mean body weight resulted a useful attribute to be included in earthworm's assessments, allowing to identify impacts in community functional composition and suggesting size dependent mechanisms. Additional research is required to comprehensively understand the mechanisms behind these patterns and to develop more sustainable agricultural practices by considering soil fauna.

1. Introduction

Earthworms play a pivotal role as soil bioengineers, given their significant influence on ecosystem functioning and structure [1,2]. Through their activities, they have a profound impact on key ecosystem processes that affect agricultural production, such as two-fold increases in plant residue decomposition [3], a 33 % increase in carbon mineralization [4], and substantial effects on soil aggregation [5] and water infiltration [6,7]. Furthermore, earthworms influence plant production, leading to an average increase of 25 % in above and belowground

primary production [8], and contributing to more than 6 % of global grain production [9].

Livestock farming and agriculture both alter soil biophysical and chemical conditions, thereby influencing the composition, structure, and functioning of earthworm communities [10–23]. Given that soil properties such as soil moisture, pH, nutrients, and soil organic matter (SOM) contents significantly determine the characteristics of earthworm communities [13,14,24], it is expected that agricultural practices directly or indirectly affecting these properties will induce changes in earthworm communities.

* Corresponding author. Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay.

E-mail addresses: andresligrone@gmail.com (A. Ligrone), malvarez@fagro.edu.uy (M. Alvarez), gjorge@fagro.edu.uy (G. Jorge-Escudero), pineiro@agro.uba.ar (G. Piñeiro).

<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103588>

Received 31 July 2023; Received in revised form 22 November 2023; Accepted 15 December 2023

Available online 27 December 2023

1164-5563/© 2023 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

However, despite the increasing available knowledge on these impacts, their seasonal dynamics are still poorly described or understood (but see Ref. [25]). For example, agricultural practices might affect juvenile and adult earthworms differently, because they have different seasonal dynamics in activity patterns and vertical movements [26–28], and therefore they respond differentially to disturbances and stresses.

In addition, earthworm body weight is a particularly relevant response functional trait, linked to movement capacity and escape from adverse conditions [14] or vulnerability to dissection [29]. Also, as an effect functional trait, it has been shown to determine their impact on water infiltration in the soil [7] or bioturbation capacity [30]. Agriculture practices might induce community level changes in mean body weight due to species turnover ([31]; e.g., a size dependent environmental filter) and/or due to an intraspecific effect (e.g. lower growth rates in soils with reduced SOM concentration), among others. Although rarely considered in most earthworm studies, understanding land use impacts on earthworm body weight at the community level should enhance our understanding of the mechanisms behind those impacts and their consequences on ecosystem functioning and services. Thus, this attribute can be easily studied as a key dimension for the characterization of functional composition of communities [7,30,32] in addition to the commonly assessed abundance, biomass, diversity and taxonomic

composition [33].

The objective of this study was to describe and quantify the effects of replacing natural grasslands (NG) with crop rotations (CR) on key attributes of earthworm communities and assess changes in soil physicochemical properties as the mechanism behind these effects. Through a paired sampling design, earthworm communities present in croplands were compared to those in adjacent extensive grazed natural grasslands (taken as controls), also evaluating the seasonal dynamics of the following community attributes: species richness, diversity, evenness, biomass, density and mean body weight. We hypothesize that earthworm communities in croplands differ from those present in natural grasslands in their species richness, diversity, evenness, density, biomass, and mean body weight, and these differences are expressed differentially over time (i.e., across seasons). We expect to observe a decrease in the value of all these community attributes in cropland soils (compared to grazed natural grasslands), and this effect to be more pronounced during periods of the year with greater earthworm activity. We also expect that differences between land uses will be explained by variations in soil physicochemical properties.

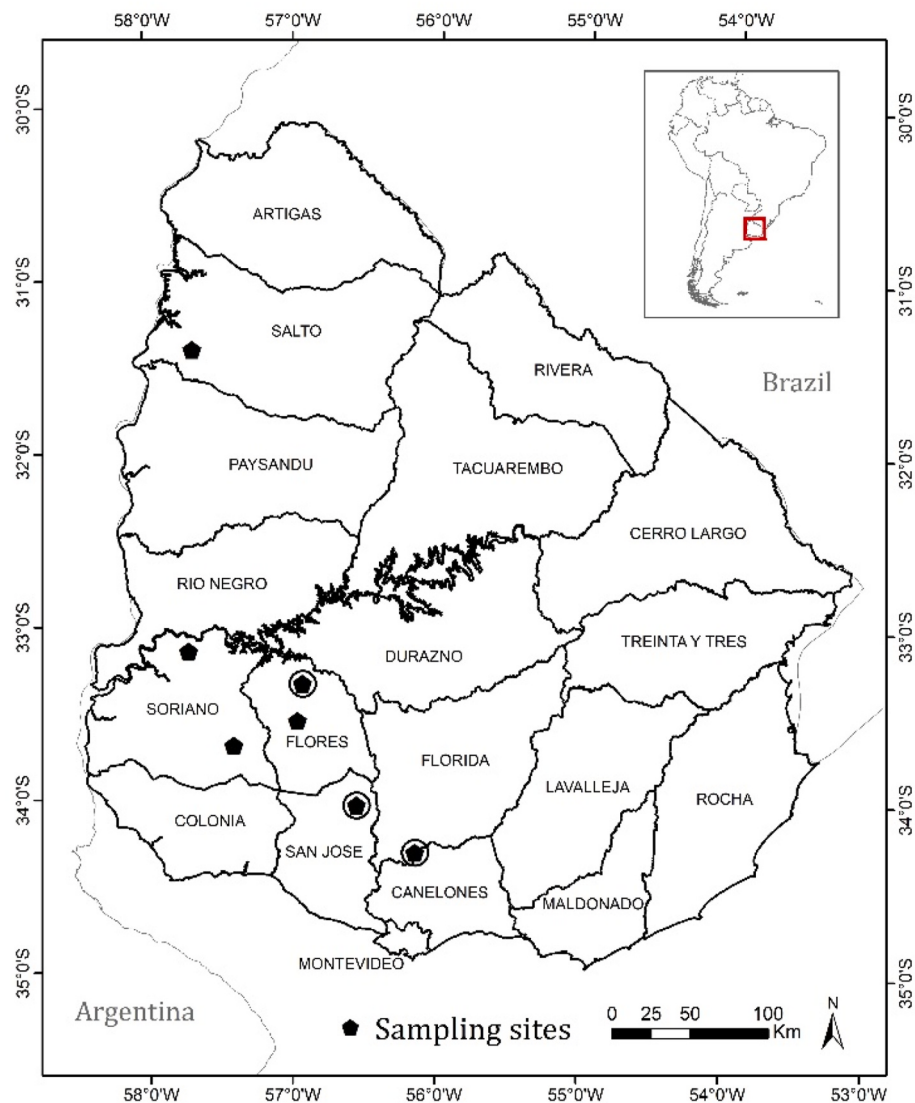


Fig. 1. Distribution in Uruguay of the 7 sampled sites in this study. All sites were sampled during the springs of 2020 and 2021. The 3 sites marked with a circle were also sampled during summer, autumn, and winter of 2021.

2. Material and methods

2.1. Study area

The study area is located in the western region of Uruguay (Fig. 1), within the Río de la Plata grasslands [34], also called the Pampas biome. This area is characterized by a temperate subtropical climate with an annual precipitation of 1100–1500 mm and an average temperature of 17 °C. The samplings were conducted during 2020 and 2021, two years under La Niña events of the ENSO, and therefore springs of both years were particularly dry.

Our study region includes the highest concentration of croplands in the country. Croplands are typically established by replacing natural grasslands, leaving remnants in some farms that are used for livestock grazing. Natural grasslands consist mostly of herbaceous vegetation, mainly short grasses with heights depending primarily on grazing intensity. Grasslands have varying proportions of sub-shrubs and shrubs of different heights and densities also associated with grazing management [34].

2.2. Experimental design and sampling sites

Earthworm communities surveys followed a paired plot design, where each sampling site consisted of a pair of immediately adjacent plots separated by a fence, differing solely in land use: annual crop rotation (CR) or extensive livestock grazing on natural grasslands (NG). Selected crop rotation plots included rotations of at least 8 years old. The main farming practices were the same for all the CR plots: no-tillage (direct drilling), use of fertilization and pesticides, summer and winter annual crops (e.g. soybean, corn or wheat), and excluded rotations with high frequency of perennial pastures. The extensive livestock grazing plots consisted of natural grassland vegetation without a history of cultivation, with similar livestock stocking rates (near 0.8 cow per hectare). To enhance comparability between sites, sandy soils, shallow soils, and soils with any degree of hydromorphism were excluded. Based on these criteria, seven sites were selected (Fig. 1), comprising Argiudolls [35]. These sites were sampled once in the spring of 2020 and again in the spring of 2021. Additionally, to consider the seasonal environmental variability, three of these seven sites were also sampled in the summer, autumn, and winter of 2021, resulting in a total of 23 sampling events.

2.3. Sample collection and processing

Earthworm sampling in each of the 2 adjacent plots (i.e., CR and NG) at each site involved extracting 8 soil monoliths, each measuring 25 cm on the sides and 20 cm depth (based on [36]). The monoliths were spaced 20 m apart from each other and from the fence separating the two plots, resulting in a minimum distance of 40 m and a maximum distance of 120 m between monoliths of both plots. To avoid biases associated with the daily activity rhythms of earthworms [37], the order of monolith extraction was randomized for each sampling event. Due to logistical difficulties, 6 monoliths were extracted from each plot instead of 8 in 2 of the 23 sampling events, totaling 352 extracted monoliths. This reduction in sampling effort was taken into account by using a rarefaction approach [38], which showed no differences between observed and modeled species richness for these 2 sampling events. Earthworm specimens were manually collected, counted, and stored in 95 % alcohol after a sedation procedure (according to Ref. [39]).

Biomass measurements: Fresh biomass (B_f) was estimated from the biomass in 95 % alcohol (B_{95}) based on a linear regression model developed from a subset of the samples ($B_f = 0.7179 * B_{95}$; $R^2 = 0.9983$; $n = 78$) with a minimum fixation time of 7 days. Biomass was weighted using a precision balance (0.01 g accuracy) after gently drying earthworm specimens with absorbent paper. From this point forward, the term “biomass” will be used to refer to estimated fresh biomass.

Taxonomic identification: Taxa were determined using a binocular microscope, based on Righi [40] and Reynolds [41], reaching species level for most cases and family or genus level for 1 and 2 species, respectively. This classification was possible only for adult specimens, as it was based on external sexual characters absent in juveniles. In some cases, identification was only possible at the genus level (i.e., one specimen from the genus *Glossoscolex*, specimens from the genus *Aporrectodea*, specimens from the genera *Kerria* and *Eukerria* of the family Ocnodrilidae), or it was not possible to distinguish all specimens (i.e., between *Microscolex dubius* and *Microscolex phosphoreus*). For these cases, categories were created to refer to the lowest taxonomic level clearly identified, i.e., *Glossoscolex* sp., Ocnodrilidae, and *Microscolex* spp. (Table 1).

2.4. Earthworm community attributes

We measured the following earthworm community attributes: i. biomass (fresh biomass per unit area, g.m^{-2}), ii. density (number of individuals per unit area, ind. m^{-2}), iii. mean body weight (mean fresh biomass per individual, g. ind^{-1}), iv. species richness (number of species), v. species diversity (Shannon-Wiener index H' [42]), and vi. evenness (Shannon-Wiener J-evenness [42]). Richness, diversity, and evenness were calculated solely based on adult specimens collected, given the difficulty of taxonomic identification for juvenile specimens. In addition, density, biomass, and mean body weight were treated according to 3 categories: total specimens and differentiated between adult and juvenile earthworms, since it is expected that these developmental stages present markedly different dynamics [26–28].

2.5. Soil physicochemical characterization

Soil physicochemical analyses were conducted using a composite soil sample from each plot (8 cylinders extracted with a soil corer nearby the monoliths). The following soil physicochemical variables were quantified: available phosphorus (P), nitrogen as nitrate (N-NO_3) and ammonium (N-NH_4), calcium (Ca), magnesium (Mg), potassium (K), sodium (Na), pH, exchangeable acidity (Ac. Int.), soil organic matter (SOM), and sand, clay, and silt contents. Soil bulk density in each plot was estimated as the mean value of 4 equidistant samples between the monoliths, taken with a 5.4 cm diameter corer. Additionally, each monolith was estimated for soil moisture percentage (water weight/wet soil weight). Except for soil moisture, which was estimated in each sampling event, the remaining soil physicochemical variables were measured only once for each site during the spring of 2021. As expected, we found significant differences in soil properties between grasslands and croplands for some soil variables. CR plots had lower K, OM, N-NH_4 , but higher BD and P (due to phosphorus fertilization in croplands) than NG plots (see Figs. 1–3 in Supplementary Material). During the more humid seasons (i.e., autumn and winter), soil moisture was significantly lower in CR plots (22.7 %) than in natural grassland (25.4 %; $p = 0.006$, paired t -test, $DF = 7$), while no differences were observed in spring and summer (CR = 18.8 %, NG = 18.6 %; $p = 0.760$, paired t -test, $DF = 7$) (see Fig. 4 in Supplementary Material).

2.6. Data analysis

To test the effect of land use on community attributes each attribute was modeled using mixed linear models, with Land Use as a fixed effect and Site nested within Season as a random effect. To remove the effect of soil moisture differences between sampling events, models included Soil Moisture as a covariate when it showed a significant correlation ($p < 0.05$) with the modeled community attribute. Similarly, mixed linear models were used to identify which environmental variables were associated with the effect of land use on earthworm community attributes. In this analysis, we tested the significance of the correlation between the effect of Land Use on community attributes and the effect of

Table 1
List of earthworm species or genera identified in croplands and natural grasslands^a.

Species	Family	Category used	Origin	Ecological category	Collected at:
<i>Glossoscolex bonariensis</i>	Glossoscolecidae	<i>Glossoscolex bonariensis</i>	Native	Endogeic	CR
<i>Glossoscolex</i> sp.	Glossoscolecidae	<i>Glossoscolex</i> sp.	Native	–	NG
<i>Eukerria stagnalis</i>	Ocnerodrilidae	Ocnerodrilidae	Native	Endogeic	Both
<i>Eukerria saltensis</i>	Ocnerodrilidae		Native	Endogeic	Both
<i>Kerriona</i> sp.	Ocnerodrilidae		Native	–	Both
<i>Microscolex dubius</i>	Acanthodrilidae	<i>Microscolex</i> spp.	Native	Epi-endogeic	Both
<i>Microscolex phosphoreus</i>	Acanthodrilidae		Native	Epi-endogeic	Both
<i>Murchieona minuscula</i>	Lumbricidae	<i>Murchieona minuscula</i>	Exotic	Endogeic	Both
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Lumbricidae	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Exotic	Endogeic	Both
<i>Aporrectodea rosea</i>	Lumbricidae	<i>Aporrectodea rosea</i>	Exotic	Endogeic	NG
<i>Aporrectodea trapezoides</i>	Lumbricidae	<i>Aporrectodea trapezoides</i>	Exotic	Endo-anecic	NG
<i>Allolobophora chlorotica</i>	Lumbricidae	<i>Allolobophora chlorotica</i>	Exotic	Endogeic	NG
<i>Octolasion cyaneum</i>	Lumbricidae	<i>Octolasion cyaneum</i>	Exotic	Endogeic	Both

^a The Category column shows the categorization used for the analysis (see Materials and Methods). The final column indicates whether the species were collected in this sampling solely in the natural field (NG), in crop rotation (CR), or in both land uses.

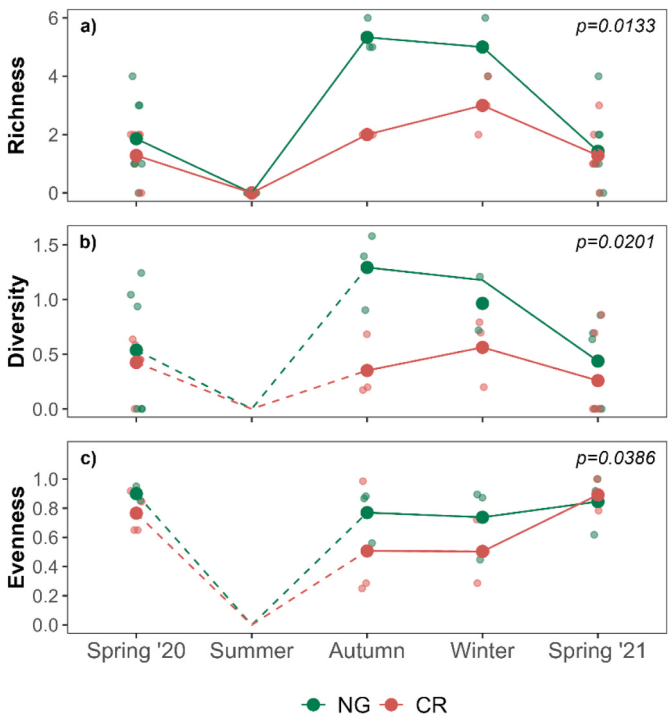


Fig. 2. Seasonal dynamics of adult earthworm species richness, Shannon diversity, and evenness. Large dots represent seasonal averages; small dots correspond to individual plots. Dashed lines show the absence of valid data values (since no adults were collected in summer). p-values correspond to significant land use effects in mixed linear models. NG: Natural grasslands; CR: Crop rotations.

Land Use on environmental variables. Thus, each variable was calculated as the difference between the Crop Rotation value minus the corresponding Natural Grassland value (for each sampling event), and then transformed to its absolute value to facilitate interpretability of results. Variables were also scaled (mean subtracted and divided by the standard deviation) to allow the comparison of the estimated coefficients. Mean soil moisture (per site and sampling event) was included as a covariate when it showed a significant correlation ($p < 0.05$) with the modeled community attribute. This approach, enabled by the paired sampling design, allowed testing the likelihood of these environmental variables as part of the mechanism behind land use effects.

For all the analyses, data was aggregated at the sampling event level, i.e., one average value for each community attribute (earthworm richness, diversity, evenness, density, biomass, and mean body weight) per

plot and season. Thus, the database has 46 values for each variable (7 sites x 2 land uses x 2 springs + 3 sites x 2 land uses x 3 remaining seasons). Although our database is unbalanced due to the lack of representation of 4 sites during summer, autumn, and winter, mixed-effect models allow the correct treatment of unbalanced data [43]. This was considered by the random effects structure and adequate variance modeling (using the R function “varIdent”, following [44]). Final models were selected based on both significance of the estimated coefficients and the Akaike Information Criterion (AIC), applying the corrected “AICc” for small sample sizes [45]. All models were validated regarding the normality of residuals (using the Shapiro-Wilk test [46]) and homoscedasticity (visual inspection and Bartlett’s test [44,46,47]). Tables 1 and 2 in the Supplementary Material show the structure of each model, indicating whether the dependent variable was log-transformed or the variance was modeled to meet model assumptions [44], and if soil moisture was included as a covariate. All analyses were performed using R software [48].

3. Results

3.1. Effect of land use on earthworm community attributes

Earthworm communities in croplands showed lower species richness, diversity and evenness compared to those in natural grassland. A total of 13 different species were collected, with 9 found in CR and 12 in NG, of which 11 were identified at the species level (Table 1). One species was only found in croplands and four were exclusive to NG (Table 1). Croplands showed a reduction of 25 % on species richness compared to natural grassland ($p = 0.0133$) and significantly lower diversity ($p = 0.0201$) and evenness ($p = 0.0386$) (Table 2, Fig. 2). These differences were only visible in autumn and winter (Fig. 2). Exotic species richness was lower in crop rotations (mean richness for each land use of CR = 1 spp. and NG = 2.1 spp., $p = 0.030$, $n = 7$, paired t -test), while native species richness was equal in both land uses (mean richness for each land use of CR = 1.9 spp. and NG = 1.9 spp., $p = 1.0$, $n = 7$, paired t -test). These differences resulted in a lower ratio of exotic to native species in CR than in NG (0.5:1 vs. 1:1, respectively; $p = 0.078$). Moreover, the exotic species *Aporrectodea trapezoides*, *Aporrectodea rosea*, and *Allolobophora chlorotica* were exclusively recorded in natural grassland plots, while only one *Aporrectodea caliginosa* adult specimen was found in crop rotations (compared to 14 adult specimens in natural grassland; Table 1). It is worth mentioning that these surveys, together with those by performed by Alvarez et al. [49] this issue], allowed for the first record of *Kerriona* genus for Uruguay, included in this work in the category Ocnerodrilidae.

Earthworm densities were lower in croplands than in natural grassland. As for richness, diversity, and evenness, the analysis revealed a significant effect of croplands on earthworm density, particularly more

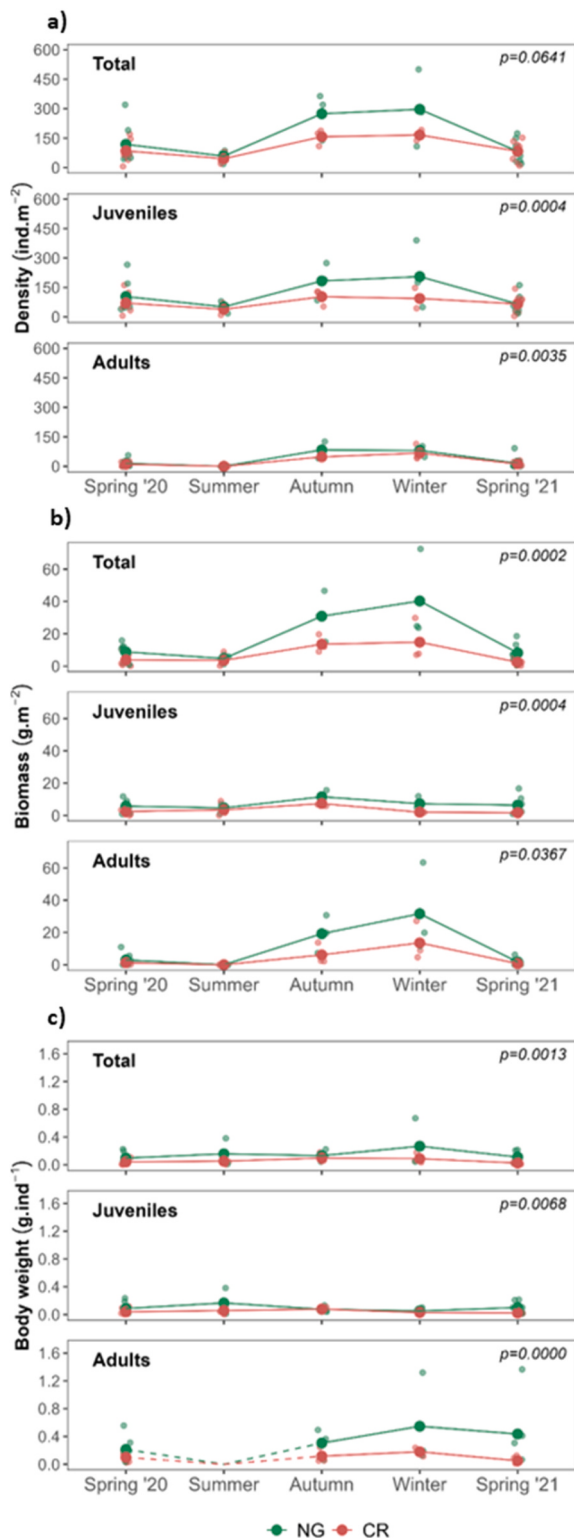


Fig. 3. Seasonal dynamics of earthworm density (a), biomass (b), and mean body weight (c), for adults, juveniles and both ("Total"). Large dots represent seasonal averages; small dots correspond to individual plots. Dashed lines show the absence of valid data values (since no adults were collected in summer). The corresponding p-values are shown for the significance of Land Use as a predictor in mixed linear models.

pronounced in autumn and winter, showing a reduction of 31 % ($p = 0.0641$) in total earthworm density, 33 % ($p = 0.0004$) in juvenile density, and 27 % in adult earthworm density ($p = 0.0035$; Fig. 3). In addition, seasonal changes in earthworm densities were observed under both land uses, particularly for smaller species such as *M. minuscula*, *Microscolex* spp., and *Ocnodrilidae* (Fig. 4). On the other hand, *Microscolex* spp. was the only species that showed higher densities in CR than in NG, mainly during autumn and winter, the seasons with higher earthworm activity (Fig. 4). No adult specimens of any species were collected in summer under either land uses.

Earthworm biomass was also lower under croplands compared to natural grasslands, showing reductions of 60 % for total earthworm biomass ($p = 0.0002$), 57 % for juvenile biomass ($p = 0.0004$) and 60 % for adult biomass ($p = 0.0367$; Table 2, Fig. 3). As with previous community attributes, differences between land uses were more pronounced in autumn and winter. As occurred with density and biomass, earthworm communities in crop rotations had significantly lower mean body weight than those in natural grassland. Our results show reductions associated with CR of 64 % for total earthworm mean body weight ($p = 0.0013$), of 60 % for juveniles ($p = 0.0068$), and 71 % for adult specimens ($p = 0.0000$; Table 2, Fig. 3). Unlike previous cases, these effects were maximized in autumn and winter only for adult earthworms, while juvenile specimens showed greater differences in mean body weight between land uses in summer and spring.

3.2. Soil physicochemical properties as mechanisms behind land use effects

Changes in earthworm variables associated with density and biomass were significantly correlated with changes in soil physicochemical properties between land uses, but not species richness, diversity and evenness (Table 2 in Supplementary Material). Total earthworm biomass differences between land use were correlated with changes in SOM and P content between land uses, while differences in P or Mg soil concentrations between land uses also explained the differences in juvenile biomass. Adult earthworm biomass differences were significantly explained by soil bulk density, while differences in earthworm mean body weight correlated with differences in K concentrations between land uses. Finally, differences in total and juvenile earthworm densities across seasons were significantly correlated with soil moisture differences between land uses (Table 2 in Supplementary Material).

4. Discussion

4.1. Effect of land use on earthworm communities

Our observations support the hypothesis that the substitution of natural grasslands with crop rotations induces profound changes in earthworm density, biomass, mean body weight, taxonomic diversity and functional composition, as reported previously for the region [17–22] and worldwide [15,16,31]. In addition, our results suggest that these changes are mainly due to the near absence of large exotic species in croplands, since all but *Mu. minuscula* were either found only in natural grasslands or represented by very few individuals, despite having abundant populations in adjacent soils. This strong negative bias in the occurrence of exotic species in croplands contradicts what is generally expected from biological invasion theory [50] but aligns with other reports for the country [28,51] this issue]. It is hypothesized that in these cases, competition is not a significant factor controlling recruitment and invasion success, and therefore earthworm assemblages are regulated by physicochemical filters such as the soil's water regime or SOM contents [52].

Beside the differences mentioned previously, earthworm communities did not show substantial differences between NG and CR regarding the composition of ecological categories. Most of the species found in both land uses were endogeic (8 out of 11), while *Microscolex dubius* and *Microscolex phosphoreus* are reported as epi-endogeic, and *Aporrectodea*

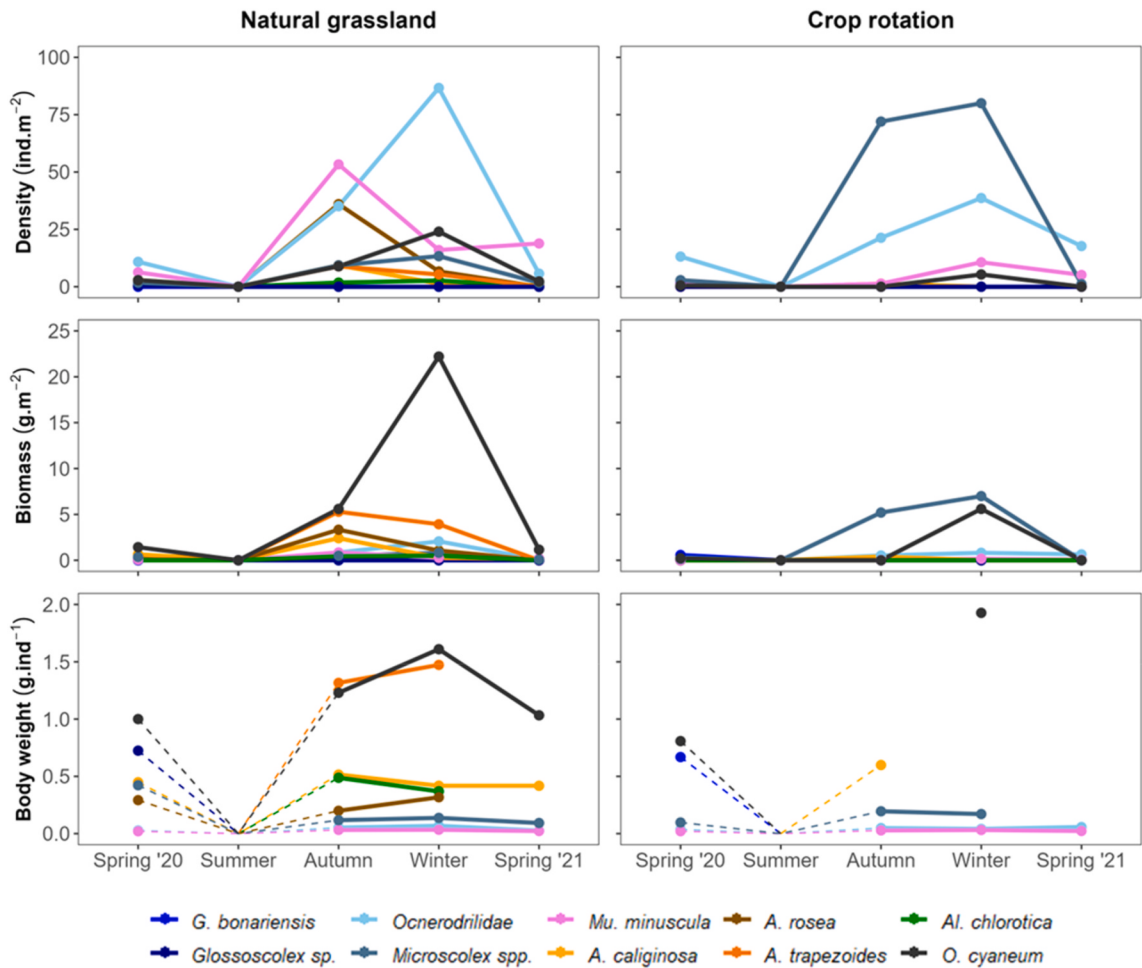


Fig. 4. Adult earthworm density (top), biomass (center), and mean body weight (bottom) for each species or taxonomic category, for Natural Grassland (left) and Crop Rotation (right). Dashed lines show the absence of valid data values (since no adults were collected in summer).

Table 2
Average changes ($\pm$ standard error) in key earthworm community attributes under both land uses.^a

Community attributes	Natural grassland	Crop rotation
Total density (ind.m ⁻²)	143 $\pm$ 27	99 $\pm$ 13
Juveniles' density (ind.m ⁻²)	109 $\pm$ 20	73 $\pm$ 10
Adults' density (ind.m ⁻²)	30 $\pm$ 9	22 $\pm$ 6
Total biomass (g.m ⁻²)	15.1 $\pm$ 3.5	6.1 $\pm$ 1.5
Juveniles' biomass (g.m ⁻²)	6.8 $\pm$ 1.0	2.9 $\pm$ 0.6
Adults' biomass (g.m ⁻²)	8.1 $\pm$ 3.0	3.2 $\pm$ 1.3
Total body weight (g.ind ⁻¹)	0.14 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01
Juveniles' body weight (g.ind ⁻¹)	0.10 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01
Adults' body weight (g.ind ⁻¹)	0.35 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.02
Species richness	4.0 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 0.5
Species diversity	0.90 $\pm$ 0.25	0.59 $\pm$ 0.14
Species evenness	0.78 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.07

^a All comparisons show significant differences ($p < 0.05$), except for Total density presenting marginal significance ($p = 0.064$). See p-values shown in Figs. 2 and 3.

trapezoides is commonly reported as endogeic but also shows characteristics of anecic species according to some authors [53,54]. However, differences observed in species composition affect the representation of functional groups (*sensu* [30,32]) and traits, regarding bioturbation behavior, feeding habits and body weight of the recorded species, as detailed below.

Land uses did change the abundances of species with different feeding habits. Croplands presented at least 6 times lower biomass of

mesohumic species than natural grasslands, species have smaller body weight in average and 5 times less biomass of species that inhabit deeper soils, i.e., *O. cyaneum* (deep bioturbator [30]) and *Glossoscolex* spp (genus also associated with grater depths). The dominant species in CR (*Microscolex* spp. and *Ocnerodrilidae*) inhabit the surface layers of the soil and are primarily polyhumic (selecting soil with high organic matter content or plant residues, as we repeatedly observed in the gut contents of *Microscolex* spp.). Thus, earthworm communities in CR are expected to present lower capacity of increasing soil water infiltration [7], present bioturbation effects at shallower depths [30], and lower mobility and escape capacity under unfavorable conditions or access to resources through foraging [14]. In addition, as stated for endogeics, species with smaller sizes and shallower soil habitats are associated with “r” strategies, and bigger species with deeper habitats regarded as “K” strategists [56]. In this vein, our observations suggest that communities present in crop rotations are predominantly “r” strategists, whereas in natural grasslands “K” strategists are better represented, in line with the expected relationship between disturbance and evolutionary strategies [57]. Finally, we found no anecic species among the sampled sites, contrary to Lavelle’s [55] prediction of high anecic biomass in temperate grasslands but is in line with other studies for Uruguay [28, 49 this issue, 51 this issue]. These observations imply that the only species in these sites maintaining the representation of surface feeding habits in CR are the native *M. dubius* and *M. phosphoreus*.

4.2. Seasonal dynamics of land use effects on earthworm communities

Seasonal dynamics of earthworm communities showed that the impacts of croplands were grater during the wetter periods, when earthworm activity is expected to be higher. Contrary to expectations, higher earthworm densities were recorded in autumn and winter, and not in spring. Therefore, differences between land uses were, smaller in spring and, as expected, almost negligible in summer (when we observed a high occurrence of estivation strategies in the samples, i.e., quiescence in aestivation chambers in smaller specimens or descent and diapause to greater depths in larger specimens (in line with [26])). However, a different pattern was observed for juvenile earthworms, which showed higher differences in mean body weight between land uses during summer. On the other hand, adult earthworms showed higher differences in mean body weight in winter and spring, corresponding to an effect of species composition (species present in NG communities have larger adults). Contrary to these observations, Coulibaly et al. [25] showed no seasonal patterns of the effects of land use practices on earthworm densities, comparing different tillage intensities. In this case, soil moisture dynamics did not seem to be coupled with land use effects, as we observed in our analysis. It is worth noting that cropland soils showed lower moisture levels than natural grasslands for most of the active part of the year for earthworms (autumn and winter), probably implying less favorable conditions for foraging [58–60]. This suggests a new hypothesis regarding the existence of an environmental filter associated with moisture thresholds for foraging, presumably species-specific and/or size-specific [58,61], determining the proportion of the year with suitable foraging conditions.

Overall, seasonal oscillations recorded in earthworm density and biomass may be due to: 1) a phenological change in populations [62] (e.g., populations change in abundance in response to seasonal environmental variability); 2) a seasonal (“slow”) change in the vertical distribution of individuals, depending on seasonal variations in factors such as humidity, temperature, or food availability [26,27], which affects the detectability of sampling (i.e., the community in summer does not change compared to the one in spring, but the probability of collection changes because individuals activate estivation behaviors); 3) a daily (“fast”) change in the vertical distribution of individuals, depending on the soil moisture at the time of sampling [26]. Future work should focus on unraveling how these mechanisms act simultaneously, to better understand the effects of land use on earthworm communities. Irrespective of this, observed seasonal dynamics showed that land use effects might be severely underestimated if surveys are conducted in dry or even intermediate seasons in temperate regions (i.e., summer and spring).

4.3. Soil physicochemical properties as mechanisms behind land use effects

Variations in soil physicochemical properties explained earthworm community density, biomass, and mean body weight, although not earthworm richness, diversity, and evenness. The reduction in total and juvenile earthworm density associated to croplands was related to differences in soil moisture between land uses, which was on average 2.7% points lower in crop rotations during winter and autumn, the seasons that showed greater earthworm activity. Adult earthworm density seemed not to be affected by soil moisture, possibly due to higher weight dependent tolerance to desiccation [29] and/or greater capacity to move to moister deeper soils [26,27]. These observations are in line with other studies [62–66], and suggest that this effect of land use is mediated by an alteration of the water regime caused by agricultural practices, presumably negatively affecting smaller juvenile individuals more intensely. This may be acting as part of an environmental filter on the occurrence of exotic species, recorded either exclusively in natural grasslands (i.e., *A. trapezoides*, *A. rosea*, and *Al. chlorotica*), or in substantially higher densities (*A. caliginosa*, *O. cyaneum*, and *Mu. minuscula*).

Observed decreases in earthworm total biomass due to crop rotations

compared to natural grasslands were associated with differences in SOM and P contents. While a positive relationship between earthworm biomass and SOM content is expected [13,14,24], we show that approximately a 30 % decrease in SOM content due to agriculture land use (Fig. 1 in Supplementary Materials) is a primary mechanism behind the observed differences in earthworm community biomass. We associate the observed (negative) correlation between differences in soil P and earthworm biomass to the high concentrations of P observed in CR compared to NG (due to fertilization). In line with reports by Jorge-Escudero [51 this issue], the substantial reduction in earthworm mean body weight in croplands compared to grasslands observed in this work was due to the absence of species that reach larger sizes, and not related to a reduction in mean body weight within species. The observed strong correlation between mean body weight and K was not expected, and we did not find any other similar report nor link with any mechanistic (e.g., physiological) explanation.

5. Conclusions

In this study, we examined the effects of croplands on earthworm communities in comparison to grazed natural grasslands. Supporting our hypothesis, our findings demonstrate a clear negative impact of crop rotations on earthworm diversity, density, biomass, and mean body weight, some of them associated with variations in soil physicochemical properties induced by this land use. The observed differences are presumably the result of an environmental filter that limits the occurrence of larger exotic species in croplands and suggest that soil water regimes (particularly affecting juvenile individuals) and SOM content play a crucial role in shaping earthworm assemblages in these agroecosystems.

The absence of anecic species in croplands is noteworthy and aligns with other studies performed in rural sites of Uruguay. Differences in species identity between land uses are also reflected at the functional level, probably in terms of effects on soil water infiltration and bioturbation behavior. The dominance of smaller, surface-feeding species in croplands compared to larger deeper-burrowing species in natural grasslands highlights the functional shifts associated with land use change and a shift to a dominance of *r* strategists. Although rarely considered, the assessment of land use effects on earthworm mean body weight allowed to identify i) impacts in community functional composition and ii) a marked pattern suggesting the influence of a size dependent environmental filter.

Seasonal dynamics further revealed that the differences between land uses are more pronounced during wetter periods and suggest the existence of minimum moisture thresholds for foraging. This underscores the importance of considering seasonal variations and soil moisture levels when evaluating the impact of land use on earthworm communities, which might be underestimated when only intermediate humid seasons are considered (e.g. spring in the studied region). Including winter in these surveys, as other studies are also implementing in this region, provided valuable information for the analysis of agricultural impacts on earthworm communities.

Our study shed light on the consequences of agricultural land use on earthworm communities, describing seasonal patterns and the underlying mechanisms driving these changes. Understanding the effects of land use on these soil organisms can guide conservation efforts and enhance ecosystem services provided by earthworms in agricultural landscapes. Further research is needed to fully elucidate the mechanisms driving these observed patterns and to design more sustainable agriculture practices and agroecosystems.

Potential reviewers

Why this helps us and helps you. Suggesting reviewers is optional. If your manuscript is sent out for review, 1–3 peer reviewers will review your work. Of those reviewers, one may be a reviewer that you have suggested – because you may have insight into reviewers who can judge

your work objectively, in the appropriate context. Please suggest three reviewers (name, institution, email, expertise). **Criteria:** Suggested reviewers should NOT be at your institution and should have some expertise in your content area/method. You should NOT have substantially worked with the reviewer in the past few years, and in particular, this should not be someone who has already reviewed or otherwise contributed to the manuscript. To the best of your knowledge, reviewers should not have conflicts (financial, personal) which would interfere with their objectivity.

CRediT authorship contribution statement

Andrés Ligrone: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Máximo Alvarez:** Conceptualization, Data curation, Methodology. **Gabriella Jorge-Escudero:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gervasio Piñeiro:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the author(s) used ChatGPT in order to translate the manuscript from spanish to english. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: A. Ligrone reports financial support was provided by National Agency for Research and Innovation (ANII). A. Ligrone reports financial support was provided by Academic Commission for Postgraduate Studies (UdelaR).

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was possible thanks to the several honorary field collaborators, to whom we are immensely thankful. We also want to thank all farm owners and managers who gave us the opportunity to conduct the surveys and provided vital help in the field. Finally, we want to thank the staff of the Agronomy Faculty at University of the Republic (Uruguay) who greatly facilitated our laboratory work, Dr. Juan Manuel Piñeiro for his assistance with the statistical analysis, Dr. Samuel James and Dr. Marie Bartz for assistance in taxonomic identification and the editor and anonymous reviewers for their valuable contributions. This study was funded by the National Agency for Research and Innovation (ANII) and supported by the Academic Commission for Postgraduate Studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103588>.

References

- [1] P. Lavelle, T. Decaens, M. Aubert, S. Barot, M. Blouin, F. Bureau, P. Margerie, P. Mora, J.-P. Rossi, Soil invertebrates and ecosystem services, *Eur. J. Soil Biol.* 42 (2006) S3–S15, <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.10.002>.
- [2] M. Blouin, M.E. Hodson, E.A. Delgado, G. Baker, L. Brussaard, K.R. Butt, J. Dai, L. Dendooven, G. Peres, J.E. Tondoh, D. Cluzeau, J.-J. Brun, A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services: earthworm impact on ecosystem services, *Eur. J. Soil Sci.* 64 (2013) 161–182, <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>.
- [3] W. Huang, G. González, X. Zou, Earthworm abundance and functional group diversity regulate plant litter decay and soil organic carbon level: a global meta-analysis, *Appl. Soil Ecol.* 150 (2020), 103473, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103473>.
- [4] I.M. Lubbers, K.J. van Groenigen, S.J. Fonte, J. Six, L. Brussaard, J.W. van Groenigen, Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms, *Nat. Clim. Change* 3 (2013) 187–194, <https://doi.org/10.1038/nclimate1692>.
- [5] H. Bossuyt, J. Six, P.F. Hendrix, Interactive effects of functionally different earthworm species on aggregation and incorporation and decomposition of newly added residue carbon, *Geoderma* 130 (2006) 14–25, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.005>.
- [6] R.O. Clements, P.J. Murray, R.G. Sturdy, The impact of 20 years' absence of earthworms and three levels of N fertilizer on a grassland soil environment, *Agric. Ecosyst. Environ.* 36 (1991) 75–85, [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(91\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0167-8809(91)90037-X).
- [7] Q.V. Pham, T.T. Nguyen, D.H. Lam, Y. Capowiez, A.D. Nguyen, P. Jouquet, T. M. Tran, N. Bottinelli, Using morpho-anatomical traits to predict the effect of earthworms on soil water infiltration, *Geoderma* 429 (2023), 116245, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.116245>.
- [8] J.W. van Groenigen, I.M. Lubbers, H.M.J. Vos, G.G. Brown, G.B. De Deyn, K.J. van Groenigen, Earthworms increase plant production: a meta-analysis, *Sci. Rep.* 4 (2015) 6365, <https://doi.org/10.1038/srep06365>.
- [9] S.J. Fonte, M. Hsieh, N.D. Mueller, Earthworms contribute significantly to global food production, *Nat. Commun.* 14 (2023) 5713, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41286-7>.
- [10] J. Lagerlöf, O. Pålsson, J. Arvidsson, Earthworms influenced by reduced tillage, conventional tillage and energy forest in Swedish agricultural field experiments, *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci* 62 (2012) 235–244, <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.602717>.
- [11] P. Lavelle, A. Spain, *Soil Ecology*, Springer Science&Business Media, 2002.
- [12] T. Decaens, J.J. Jiménez, Earthworm communities under an agricultural intensification gradient in Colombia, *Plant Soil* 240 (2002) 133–143, <https://doi.org/10.1023/A:1015844610604>.
- [13] A.S.A. Johnston, R.M. Sibly, M.E. Hodson, T. Alvarez, P. Thorbek, Effects of agricultural management practices on earthworm populations and crop yield: validation and application of a mechanistic modelling approach, *J. Appl. Ecol.* 52 (2015) 1334–1342, <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12501>.
- [14] J.P. Curry, Factors affecting the abundance of earthworms in soils, in: C. A. Edwards (Ed.), *Earthworm Ecology*, second ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, 2004.
- [15] J.P. Curry, P. Doherty, G. Purvis, O. Schmidt, Relationships between earthworm populations and management intensity in cattle-grazed pastures in Ireland, *Appl. Soil Ecol.* 39 (2008) 58–64, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.11.005>.
- [16] C.A. Edwards, N.Q. Arancon, Effects of agricultural practices and chemicals on earthworms, in: *Biology and Ecology of Earthworms*, Springer US, New York, NY, 2022, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74943-3>.
- [17] N. Clemente, A. López, A. Vincini, H.A. Castillo, D. Carmona, P. Manetti, S. S. Martino, Abundancia de megadrilos (annelida: oligochaeta) en diferentes sistemas de producción, *Ciencia del Suelo*, 2003, p. 9.
- [18] A. Domínguez, J.J. Jiménez, C.E. Ortiz, J.C. Bedano, Soil macrofauna diversity as a key element for building sustainable agriculture in Argentine Pampas, *Acta Oecol.* 92 (2018) 102–116, <https://doi.org/10.1016/j.actao.2018.08.012>.
- [19] A. Domínguez, J.C. Bedano, A.R. Becker, Negative effects of no-till on soil macrofauna and litter decomposition in Argentina as compared with natural grasslands, *Soil Tillage Res.* 110 (2010) 51–59, <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.06.008>.
- [20] A. Domínguez, J.C. Bedano, Earthworm and enchytraeid Co-occurrence pattern in organic and conventional farming: consequences for ecosystem engineering, *Soil Sci.* 181 (2016) 148, <https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000146>.
- [21] A. Domínguez, J.C. Bedano, A.R. Becker, Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina, *Cienc. del Suelo* 27 (2009) 11–19.
- [22] L. Falco, R. Sandler, F. Momo, C. Di Ciocco, L. Saravia, C. Coviella, Earthworm assemblages in different intensity of agricultural uses and their relation to edaphic variables, *PeerJ* 3 (2015) e979, <https://doi.org/10.7717/peerj.979>.
- [23] FAO, ITPS, GSB, SCBD, EC, State of Knowledge of Soil Biodiversity - Status, Challenges and Potentialities: Report 2020, FAO, Rome, Italy, 2020, <https://doi.org/10.4060/cb1928en>.
- [24] J. Singh, M. Schädler, W. Demetrio, G.G. Brown, N. Eisenhauer, Climate change effects on earthworms - a review, (n.d.). <https://doi.org/10.25674/SO91ISS3PP114>.
- [25] S.F.M. Coulibaly, M. Aubert, N. Brunet, F. Bureau, M. Legras, M. Chauvat, Short-term dynamic responses of soil properties and soil fauna under contrasting tillage systems, *Soil Tillage Res.* 215 (2022), 105191, <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105191>.
- [26] B.M. Gerard, Factors affecting earthworms in pastures, *J. Anim. Ecol.* 36 (1967) 235–252, <https://doi.org/10.2307/3024>.

- [27] J.C. Buckerfield, Earthworm populations in dryland cropping soils under conservation-tillage in south Australia, *Soil Biol. Biochem.* 24 (1992) 1667–1672, [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90167-V](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90167-V).
- [28] M.S. Zerbino, Efecto de rotaciones cultivo-pasturas en siembra directa, con pastoreo, sobre comunidades de Oligochaeta, *Agrociencia* 16 (2012) 15–23.
- [29] W.C. Grant, Studies on moisture relationships in earthworms, *Ecology* 36 (1955) 400–407, <https://doi.org/10.2307/1929574>.
- [30] Y. Capowiez, D. Marchán, T. Decaëns, M. Hedde, N. Bottinelli, Let earthworms be functional - definition of new functional groups based on their bioturbation behavior, *Soil Biol. Biochem.* 188 (2023), 109209, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109209>.
- [31] W.S. Andriuzzi, M.M. Puleman, D. Cluzeau, G. Pérès, Comparison of two widely used sampling methods in assessing earthworm community responses to agricultural intensification, *Appl. Soil Ecol.* 119 (2017) 145–151, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.011>.
- [32] N. Bottinelli, Y. Capowiez, Earthworm ecological categories are not functional groups, *Biol. Fertil. Soils* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01517-1>.
- [33] H.R.P. Phillips, E.M. Bach, M.L.C. Bartz, J.M. Bennett, R. Beugnon, M.J.I. Briones, G.G. Brown, O. Ferlian, K.B. Gongalsky, C.A. Guerra, B. König-Ries, J.J. Krebs, A. Orgiazzi, K.S. Ramirez, D.J. Russell, B. Schwarz, D.H. Wall, U. Brose, T. Decaëns, P. Lavelle, M. Loreau, J. Mathieu, C. Mulder, W.H. van der Putten, M.C. Rillig, M. P. Thakur, F.T. de Vries, D.A. Wardle, C. Ammer, S. Ammer, M. Arai, F.O. Ayuke, G. H. Baker, D. Baretta, D. Barkusky, R. Beauséjour, J.C. Bedano, K. Birkhofer, E. Blanchart, B. Blossey, T. Bolger, R.L. Bradley, M. Brossard, J.C. Burtis, Y. Capowiez, T.R. Cavagnaro, A. Choi, J. Clause, D. Cluzeau, A. Coors, F.V. Crotty, J.M. Crumsey, A. Dávalos, D.J.D. Cosin, A.M. Dobson, A. Domínguez, A.E. Duhour, N. van Eekeren, C. Emmerling, L.B. Falco, R. Fernández, S.J. Fonte, C. Frago, A.L. C. Franco, A. Fusilero, A.P. Gerasikina, S. Gholami, G. González, M.J. Gundale, M. G. López, B.K. Hackenberger, D.K. Hackenberger, L.M. Hernández, J.R. Hirth, T. Hishi, A.R. Holdsworth, M. Holmstrup, K.N. Hopfensperger, E.H. Lwanga, V. Huhta, T.T. Hurisso, B.V. Iannone, M. Iordache, U. Irmiler, M. Ivask, J.B. Jesús, J. L. Johnson-Maynard, M. Joschko, N. Kaneko, R. Kanianska, A.M. Keith, M. L. Kernecker, A.W. Koné, Y. Kooch, S.T. Kukkonen, H. Lalthanzara, D.R. Lammel, I. M. Lebedev, E. Le Cadre, N.K. Lincoln, D. López-Hernández, S.R. Loss, R. Marichal, R. Matula, Y. Minamiya, J.H. Moos, G. Moreno, A. Morón-Ríos, H. Motohiro, B. Muys, J. Neirynck, L. Norgrove, M. Novo, V. Nuutinen, V. Nuzzo, P. Mujeeb Rahman, J. Pansu, S. Paudel, G. Pérès, L. Pérez-Camacho, J.-F. Ponge, J. Prietzel, I. B. Rapoport, M.I. Rashid, S. Rebollo, M.Á. Rodríguez, A.M. Roth, G.X. Rousseau, A. Rozen, E. Sayad, L. van Schaik, B. Scharenbroch, M. Schirrmann, O. Schmidt, B. Schröder, J. Seeber, M.P. Shashkov, J. Singh, S.M. Smith, M. Steinwandter, K. Szlavecz, J.A. Talavera, D. Trigo, J. Tsukamoto, S. Uribe-López, A.W. de Valença, I. Virto, A.A. Wackett, M.W. Warren, E.R. Webster, N.H. Wehr, J. K. Whalen, M.B. Wironen, F. Wolters, P. Wu, I.V. Zenkova, W. Zhang, E. K. Cameron, N. Eisenhauer, Global data on earthworm abundance, biomass, diversity and corresponding environmental properties, *Sci. Data* 8 (2021) 136, <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00912-z>.
- [34] A. Soriano, Natural grasslands: introduction and western hemisphere, in: *Ecosystems of the World*, Elsevier, Amsterdam London New York, 1992 [etc.].
- [35] I.C. Baillie, Soil survey staff 1999, soil taxonomy, *Soil Use Manag.* 17 (2001) 57–60, <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2001.tb00008.x>.
- [36] J.M. Anderson, J.S.I. Ingram, International union of biological sciences, international society of soil science, in: *Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods*, 2, CAB International, Wallingford, 1993.
- [37] C.L. Ralph, Persistent rhythms of activity and O₂-Consumption in the earthworm, *Physiol. Zool.* 30 (1957) 41–55, <https://doi.org/10.1086/physzool.30.1.30166307>.
- [38] A. Chao, N.J. Gotelli, T.C. Hsieh, E.L. Sander, K.H. Ma, R.K. Colwell, A.M. Ellison, Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies, *Ecol. Monogr.* 84 (2014) 45–67, <https://doi.org/10.1890/13-0133.1>.
- [39] G. Righi, Minhocas de mato grosso e rondonia, 1990. <https://repositorio.usp.br/it-em/000806815>. (Accessed 31 October 2023).
- [40] G. Righi, Introducción al estudio de las lombrices del suelo (Oligoquetos megadrilos) de la provincia de Santa Fé (Argentina), *Asociación de Ciencias Naturales Del Litoral*, 1979.
- [41] J. Reynolds, J.W. Reynolds, *Earthworm Biology and Ecology*, Lindsay: Sir Sandford Fleming College and Blewett Printing, Ltd., 1996, p. 196 [English, Spanish; abstr. none], 1996.
- [42] A.E. Magurran, in: *Measuring Biological Diversity*, first ed., Wiley-Blackwell, 2013. https://www.perlego.com/book/1006601/measuring-biological-diversity-pdf?utm_source=google&utm_medium=cpc&campaignid=19682358476&adgroupid=141265931730&gclid=Cj0KCQjwy4KqBhD0ARIsAEbCr6jDSCntSP9kUpTvKl5-IrK93CQ4Fwgrkw66G-YRzQvp2RC1muJfymMaAhSJEALw_wcB. (Accessed 31 October 2023).
- [43] J. Pinheiro, D. Bates, *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*, Springer Science & Business Media, 2000.
- [44] A.F. Zuur, E.N. Ieno, N. Walker, A.A. Saveliev, G.M. Smith, *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*, Springer, New York, NY, 2009, <https://doi.org/10.1007/978-0-387-87458-6>.
- [45] D.R. Anderson, K.P. Burnham, Avoiding pitfalls when using information-theoretic methods, *J. Wildl. Manag.* 66 (2002) 912–918, <https://doi.org/10.2307/3803155>.
- [46] A.F. Zuur, E.N. Ieno, C.S. Elphick, A protocol for data exploration to avoid common statistical problems, *Methods Ecol. Evol.* 1 (2010) 3–14, <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x>.
- [47] M.S. Bartlett, Properties of sufficiency and statistical tests, *proceedings of the royal society of london, Series A - Mathematical and Physical Sciences* 160 (1997) 268–282, <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>.
- [48] R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, 2022. <https://www.R-project.org/>.
- [49] M. Alvarez, A. Ligrone, G. Piñeiro, G. Jorge-Escudero, Effects of cropping sequences and rotational grazing on diversity, biomass, density, and body weight of earthworms, *Eur. J. Soil Biol.* (This issue).
- [50] S.W. James, Earthworms, in: *Encyclopedia of Biological Invasions*, University of California Press, 2011.
- [51] G. Jorge-Escudero, A. Ligrone, C. Pérez, C. Martínez, J. Cadenazzi, J. Lagerlöf, Land use effect on dominance of native and exotic earthworm species in two contrasting rural landscapes, *Eur. J. Soil Biol.* (This issue).
- [52] H. Eijsackers, Earthworms as colonizers of natural and cultivated soil environments, *Appl. Soil Ecol.* 50 (2011) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.07.008>.
- [53] N. Bottinelli, M. Hedde, P. Jouquet, Y. Capowiez, An explicit definition of earthworm ecological categories – marcel Bouché's triangle revisited, *Geoderma* 372 (2020), 114361, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114361>.
- [54] M. Gutiérrez-López, G. Moreno, D. Trigo, E. Juárez, J.B. Jesús, D.J. Díaz Cosin, The efficiency of earthworm extraction methods is determined by species and soil properties in the Mediterranean communities of Central-Western Spain, *Eur. J. Soil Biol.* 73 (2016) 59–68, <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.01.005>.
- [55] P. Lavelle, The structure of earthworm communities, in: J.E. Satchell (Ed.), *Earthworm Ecology*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1983, <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5965-1>.
- [56] P. Lavelle, *Stratégies de reproduction chez les vers de terre*, *Acta Oecologica (Ecologia Generalis)* 2 (1981) 117–133.
- [57] J.P. Grime, S. Pierce, *The Evolutionary Strategies that Shape Ecosystems*, John Wiley & Sons, 2012.
- [58] P. Daugbjerg, Temperature and moisture preferences of three earthworm species (Oligochaeta, Lumbricidae), *Pedobiologia* 32 (1988) 57–64, [https://doi.org/10.1016/S0031-4056\(23\)00216-0](https://doi.org/10.1016/S0031-4056(23)00216-0).
- [59] L.A. Wever, T.J. Lysyk, M.J. Clapperton, The influence of soil moisture and temperature on the survival, aestivation, growth and development of juvenile Aporectodea tuberculata (Eisen) (Lumbricidae), *Pedobiologia* 45 (2001) 121–133, <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00074>.
- [60] B.M. Doube, C. Styan, The response of Aporectodea rosea and Aporectodea trapezoides (Oligochaeta: lumbricidae) to moisture gradients in three soil types in the laboratory, *Biol. Fertil. Soils* 23 (1996) 166–172, <https://doi.org/10.1007/BF00336058>.
- [61] J.M. Perreault, J.K. Whalen, Earthworm burrowing in laboratory microcosms as influenced by soil temperature and moisture, *Pedobiologia* 50 (2006) 397–403, <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.07.003>.
- [62] G.H. Baker, V.J. Barrett, P.J. Carter, P.M.L. Williams, J.C. Buckerfield, Seasonal changes in abundance of earthworms (Annelida: Lumbricidae and Acanthodrilidae) in soils used for cereal and lucerne production in South Australia, *Aust. J. Agric. Res.* 44 (1993) 1291–1301, <https://doi.org/10.1071/ar9931291>.
- [63] P. Eggleton, K. Inward, J. Smith, D.T. Jones, E. Sherlock, A six year study of earthworm (Lumbricidae) populations in pasture woodland in southern England shows their responses to soil temperature and soil moisture, *Soil Biol. Biochem.* 41 (2009) 1857–1865, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.06.007>.
- [64] L.R. Potvin, E.A. Lilleskov, Introduced earthworm species exhibited unique patterns of seasonal activity and vertical distribution, and Lumbricus terrestris burrows remained useable for at least 7 years in hardwood and pine stands, *Biol. Fertil. Soils* 53 (2017) 187–198, <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1173-x>.
- [65] G.H. Baker, V.J. Barrett, R. Grey-Gardner, J.C. Buckerfield, The life history and abundance of the introduced earthworms Aporectodea trapezoides and A. caliginosa (Annelida: lumbricidae) in pasture soils in the Mount Lofty Ranges, South Australia, *Aust. J. Ecol.* 17 (1992) 177–188, <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1992.tb00796.x>.
- [66] G. Baker, J. Buckerfield, R. Grey-Gardner, R. Merry, B. Doube, The abundance and diversity of earthworms in pasture soils in the fleurieu peninsula, south Australia, *Soil Biol. Biochem.* 24 (1992) 1389–1395, [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90123-F](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90123-F).

CAPÍTULO 3. LAS LOMBRICES FAVORECEN LA FORMACIÓN Y PRESERVACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO EN DIFERENTES FRACCIONES DEL SUELO SEGÚN SUS HÁBITOS ALIMENTICIOS Y LA CALIDAD Y UBICACIÓN DEL RESIDUO VEGETAL PRESENTE

INTRODUCCIÓN

Las lombrices modifican la estructura y el funcionamiento del suelo y por lo tanto los servicios ecosistémicos que éstos brindan (Bertrand et al., 2015; Blouin et al., 2013; Lavelle & Spain, 2002). A través de su actividad inciden de forma significativa en procesos centrales para la producción agropecuaria, logrando por ejemplo aumentos promedio del 100% en las tasas de descomposición de residuos vegetales, aumentos de 33% en mineralización del carbono (W. Huang et al., 2020; Lubbers et al., 2013), y cambios sustanciales en la agregación del suelo (Bossuyt et al., 2006) e infiltración del agua (Hallam et al., 2020). Sus efectos también impactan a nivel productivo, por ejemplo aumentando en promedio ca. 25% la producción de biomasa vegetal aérea y subterránea (van Groenigen et al., 2015).

En particular, es importante entender la incidencia de las lombrices en la dinámica de incorporación, estabilización y mineralización del carbono orgánico del suelo (COS), procesos clave para la integridad ecológica y salud del suelo en ecosistemas naturales y agroecosistemas (Smith et al., 2015). A su vez, las diferentes fracciones del suelo pueden presentar respuestas diferentes a la acción de las lombrices. La materia orgánica particulada (POM por sus siglas en inglés) y la materia orgánica asociada a minerales (MAOM), de mayor y menor biodisponibilidad y velocidad de ciclado, respectivamente, son fracciones cada vez más utilizadas en el estudio de la dinámica del COS (Cotrufo & Lavelle, 2022). Conocer cómo los factores mencionados anteriormente determinan la entrada o salida del C a estas fracciones es clave para avanzar en la comprensión del rol de la biota del suelo sobre la dinámica del COS y el funcionamiento ecosistémico (Angst et al. 2024).

Las lombrices pueden incidir en estos procesos mediante mecanismos como la protección o desprotección del COS o C vegetal en micro y macroagregados y su estabilización o mineralización mediante la alteración de la comunidad microbiana (Angst et al., 2024). A pesar de su relevancia, los efectos de su actividad sobre la dinámica del COS son aún poco

comprendidos, por ejemplo, respecto a qué condiciones promueven estos mecanismos asociados al secuestro o a la mineralización del COS (Angst et al., 2024; W. Huang et al., 2020; Thomas et al., 2020). Entre otros, algunos factores determinantes de estos mecanismos son i) las características de la biomasa vegetal presente, e.g. la relación C:N y entonces su propensión a la descomposición (Aerts, 1997) y palatabilidad (Hendriksen, 1990; Schönholzer et al., 1998); ii) la comunidad de microorganismos presente (e.g. abundancia y actividad enzimática); iii) la especie de lombriz (e.g. de hábitos alimenticios geófagos o saprófagos; Bossuyt et al., 2006; Gilbert et al., 2014; J. Huang et al., 2015); y iv) la ubicación de los residuos vegetales (i.e. en superficie o enterrados; Le Couteulx et al., 2015).

Dependiendo de su forma de vida (e.g. grupos funcionales como “burrower”, “bioturbator”, “litter dweller” o “tunneler”; Capowiez et al. (2024) y hábitos alimenticios (e.g. geófago o saprótrofo) las lombrices interactúan diferencialmente con el COS y el C de la biomasa vegetal, consumiendo más o menos suelo, o interactuando con biomasa ubicada en superficie o en la profundidad del suelo. Esta actividad modifica la accesibilidad del C a la acción de los microorganismos (Angst et al., 2019) así como a las propias comunidades de microorganismos (Ahmed & Al-Mutairi, 2022). Así, lombrices con diferentes hábitos alimenticios promueven diferentes mecanismos de incorporación y estabilización del C vegetal al suelo (e.g. vía in-vivo o “direct sorption”; Sokol, Sanderman, et al., 2019) así como de reorganización del COS ya presente (e.g. priming, desprotección o protección física en agregados; Bossuyt et al., 2006; Eck et al., 2015). En particular, es esperable que lombrices endógeas (usualmente geófagas) ingieran principalmente suelo mineral e interactúen con el tejido subterráneo de las plantas, mientras que lombrices anécicas (usualmente saprófagas) interactúen en mayor medida con residuos vegetales en superficie, promoviendo su enterramiento o mezcla con el suelo mineral (Vidal et al., 2017). A su vez, sabemos que el aporte subterráneo de C de las plantas (desde raíces muertas o rizodeposición) es sustancial en términos de cantidad y de funcionamiento, con tasas de humificación entre 2 y 13 veces mayor a las de tejidos aéreos (Cotrufo & Lavalley, 2022; Sokol et al., 2024; Sokol, Kuebbing, et al., 2019; Villarino et al., 2021). La rizodeposición puede representar un 60% del C presente en las raíces de una planta, aunque esta proporción es muy variable entre especies pudiendo llegar a ser casi 20 veces mayor en la leguminosa *Vicia sativa* que en la gramínea *Avena sativa* (Berenstecher et al. 2024). En este sentido, conocer en qué medida el efecto de las lombrices sobre el destino del C vegetal depende de esta proporción es especialmente relevante para el manejo sostenible de agroecosistemas, en los que el uso de cultivos de servicio está siendo cada vez más extendido (Pinto et al., 2017).

El objetivo de este trabajo fue comprender el efecto de dos especies de lombrices de hábitos de vida diferentes, *Aporrectodea caliginosa* (endógea geófaga) y *Lumbricus friendi* (anécica saprófaga), sobre la formación de COS y el destino del C de biomasa vegetal de calidad contrastante, una gramínea (*Avena strigosa*) y una leguminosa (*Vicia villosa*), para distintas fracciones de la materia orgánica del suelo (i.e. POM y MAOM). Se plantea como hipótesis que la actividad de las lombrices altera la tasa de incorporación de carbono al suelo desde los residuos vegetales, y que estos efectos difieren entre especies de lombrices, calidad y ubicación del tejido vegetal y entre las fracciones del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un experimento de microcosmos en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Los microcosmos consistieron en macetas plásticas de ca. 1.7 L a las que se adicionó ca. 1500 g de suelo seco, alcanzando 10 cm de profundidad, con un diámetro de 12 cm en la base y 14 cm en la superficie. El suelo fue extraído de los primeros 10 cm de una parcela de cultivo agrícola orgánica (sin uso agroquímicos), ubicada en la zona rural del departamento de Montevideo; sus propiedades se presentan en Tabla 1. El suelo fue secado al aire, tamizado a 2 mm y tratado mediante dos ciclos de congelamiento (-20 °C) y descongelamiento en base a Sulkava & Huhta (2003), para minimizar la presencia de meso y macrofauna remanente.

Tabla 1. Características químicas y físicas del suelo de los microcosmos al inicio de la incubación.

CO	Arena	Limo	Arcilla	pH	Ac. Int.	[Ca]	[Mg]	[K]	[Na]	[P]	[N-NO ₃]	[N-NH ₄]
-----	%	-----			-----	cmolc/kg	(meq/100g)	-----		---	mg/kg (ppm)	---
1.4	17.8	58.6	23.6	5.8	0.11	5.86	2.22	0.64	0.55	24.1	3.6	20.7

Ac. Int.: acidez intercambiable.

ETAPA DE CULTIVO Y ENRIQUECIMIENTO CON ¹³C DE LAS PLANTAS EN INVERNÁCULO

El 17 de agosto de 2021 los microcosmos fueron dispuestos en un invernáculo y en cada uno se sembró una semilla de *Vicia villosa* o *Avena strigosa* (Fig. 2). Siguiendo el protocolo propuesto por Berenstecher et al. (2023), a los pocos días de emerger las plántulas, la mitad recibió una aplicación foliar con pincel de urea enriquecida con ¹³C (Putz et al., 2011); detalles en Berenstecher et al., 2023) y la otra mitad urea comercial no enriquecida, 3 veces por semana durante la mañana, hasta el 20 de octubre de 2021, cuando las plantas alcanzaron una biomasa suficiente para culminar su etapa de crecimiento y ser suprimidas una semana después el 27 de octubre (como se detalla más adelante), finalizando así la etapa de marcado. Para evitar la contaminación accidental del suelo del microcosmos con urea, éste fue cubierto con una tela plástica. Luego de la aplicación foliar de urea los microcosmos fueron cubiertos durante 4 horas con una bolsa plástica transparente para maximizar la incorporación foliar del ¹³C volatilizado, exceptuando algunos días de calor extremo para minimizar daños por estrés térmico. Para evitar contaminación cruzada, la aplicación de la urea enriquecida fue siempre realizada luego de la aplicación de la urea no enriquecida. De igual forma, la manipulación de las muestras

enriquecidas (“marcadas”, de aquí en más) de suelo y plantas fueron procesadas siempre luego de las no enriquecidas (“no marcadas”).

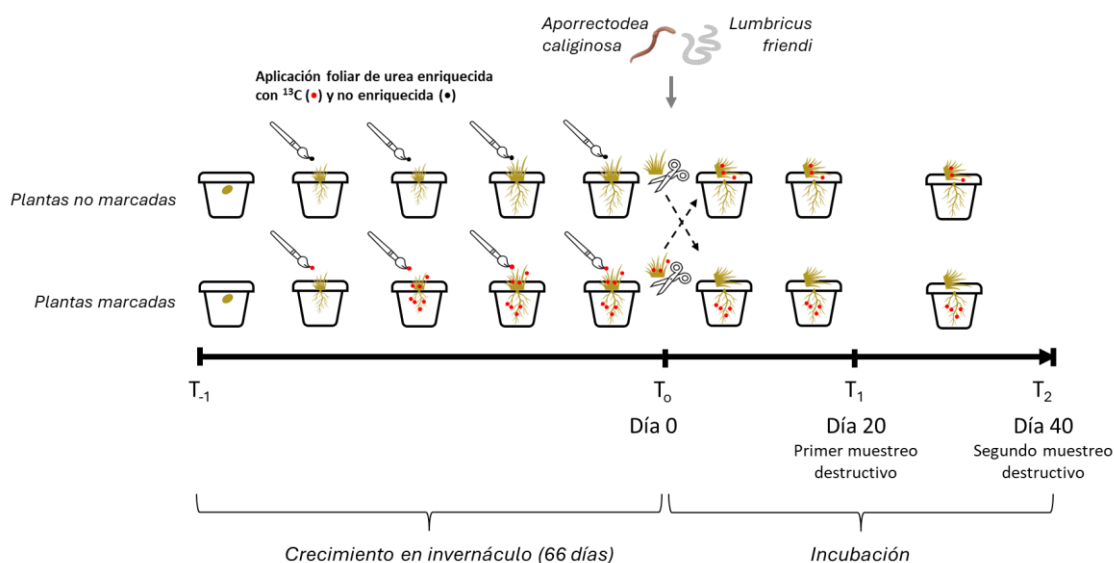


Figura 2. Etapas del experimento. En agosto de 2021 fueron sembradas semillas de *Vicia villosa* o *Avena strigosa* en macetas individuales (T₋₁), dando comienzo a la etapa de crecimiento en invernáculo, de 66 días. Para cada especie de planta, una mitad recibió aplicación foliar periódica de urea enriquecida con ¹³C (puntos rojos) y la otra mitad con urea comercial, no enriquecida (se representan únicamente macetas con avena, pero las plantas de vicia recibieron igual tratamiento). En octubre de 2021 (T₀) comenzó la etapa de incubación, con la cosecha e intercambio de partes aéreas y la introducción de las lombrices. Se realizó un muestreo destructivo a los 20 días (T₁) y otro a los 20 días (T₂).

El riego (40ml por microcosmos) fue realizado siempre inmediatamente antes de la aplicación de urea, pero también durante días adicionales dependiendo de las condiciones de calor del invernáculo. El agua de riego eventualmente percolada fue devuelta al suelo para evitar pérdidas por lixiviado. Las macetas fueron reubicadas 2 veces durante el período de crecimiento de las plantas, para reducir sesgos en condiciones ambientales por su ubicación en el invernáculo. Se controló y evitó la influencia de hormigas u otros insectos con potencial de modificar las condiciones de las plantas, así como la presencia de otros brotes o musgo.

Las especies de plantas cultivadas fueron dos cultivos de servicio invernales, con características contrastantes, comúnmente utilizados en la región: *Vicia villosa* es una leguminosa C3, con una relación C:N = 15, utilizada como cultivo de servicio para aportar N en las rotaciones de cultivos, entre otros servicios (Pinto et al., 2021); *Avena strigosa* es una gramínea C3, C:N = 28,

también utilizada como cultivo de servicio para combatir malezas, controlar la erosión y realizar aportes de C al suelo, entre otros servicios (R. Alvarez et al., 2017).

ETAPA DE ADICIÓN DE LOMBRICES E INCUBACIÓN

La etapa de incubación fue comenzada el 27 de octubre de 2021 (T_0), cuando las lombrices fueron incorporadas a los microcosmos y las plantas fueron cortadas por el tallo al ras del suelo (Fig. 2). Las partes aéreas de las plantas fueron cortadas en fragmentos de 5 cm e intercambiadas entre microcosmos, respetando la especie de planta y la cantidad de biomasa original (para mantener proporción original aéreo:raíz), pero intercambiando entre macetas con plantas marcadas con no marcadas. Así, cada microcosmos estuvo conformado por el suelo no perturbado desde la siembra de la planta, conteniendo la raíz *in-situ* (en posición de vida e incluyendo su rizodeposición), y restos vegetales aéreos dispuestos en superficie con tratamiento de urea contrario: raíz *in-situ* marcada + residuos aéreos no marcados, y viceversa. Para vicia, los residuos aéreos promediaron 3.5 g y las raíces fueron estimadas en 1.3 g; para avena, los residuos aéreos promediaron 7.4 g y las raíces fueron estimadas en 1.9 g (pesos frescos). Este diseño permitió rastrear el origen (aéreo o raíz) del C incorporado al suelo. A su vez, los microcosmos fueron asignados al azar a tres tratamientos: i) presencia de *A. caliginosa* (2 ejemplares adultos, μ = 0.9 g frescos en total); ii) presencia de *L. friendi* (2 ejemplares adultos, μ = 3.8 g frescos en total); iii) control (sin lombriz) (Fig. 3a). Las lombrices fueron sumergidas 30 minutos en agua para favorecer la hidratación inicial previo a su inclusión en los microcosmos, y estos fueron cubiertos con una malla oscura para evitar su escape pero permitir pasaje de aire. Cada combinación de planta (2 especies), tratamiento de lombriz (3, dos especies y sin lombriz) y ubicación del tejido marcado (2, aéreo o subterráneo) contó con 5 réplicas, y a su vez todo el diseño fue duplicado para realizar un muestreo destructivo intermedio, totalizando 120 macetas. A los 20 días de incubación luego del tiempo inicial (T_0), se realizó un primer muestreo destructivo de la mitad de los microcosmos (tiempo intermedio, T_1), y 20 días después un muestreo final (tiempo final, T_2), totalizando 40 días de incubación (Fig. 2). La humedad gravimétrica (w/w) de los microcosmos fue de 23% en promedio y la temperatura mantenida entre 17 y 19 °C (emulando la temperatura media anual del suelo a 10 cm de profundidad en esta región, según datos disponibles en INIA²).

² <https://www.inia.uy/gras>

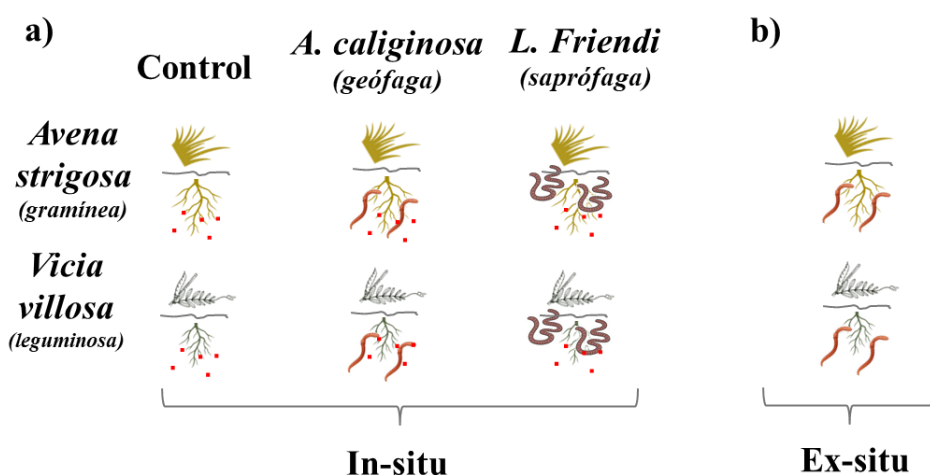


Figura 3. Tratamientos del diseño experimental. Se representan los tratamientos utilizados para el experimento “in-situ” (a) y el “ex-situ” (b), diferenciándose entre ellos por la presencia o ausencia de rizodeposición marcada (puntos rojos).

Las especies de lombrices fueron seleccionadas por sus diferencias en hábitos alimenticios y por su comparabilidad con trabajos anteriores. *Aporrectodea caliginosa* es categorizada como endógea (Bottinelli et al., 2020) y geófaga mesohúmica (Räty, 2004) o polihúmica (Szlavec et al., 2018), y muy utilizada a nivel mundial en este tipo de experimentos. *Lumbricus friendi* es anécica y saprófaga (Butt & Briones, 2011). Aunque poco utilizada a nivel mundial en experimentos, es muy similar a *Lumbricus terrestris*, ampliamente utilizada (Butt & Briones, 2011; Csuzdi & Szlavecz, 2003). Si bien es posible que *A. caliginosa* pueda consumir biomasa en superficie (Le Couteulx et al., 2015) y *L. friendi* tejido de raíz, como ha sido registrado para *L. terrestris* (Cortez & Bouche, 1992; Gilbert et al., 2014) las diferencias en sus hábitos alimenticios y actividad de alimentación son sustanciales. En particular, a pesar de cuantificar algunas similitudes entre estas especies, Capowiez et al. (2024) registraron el doble de producción de deyecciones para *A. caliginosa*, 25% menos consumo de residuos vegetales en superficie y ca. 4 veces más volumen total de galerías (valores ajustados por peso de lombriz por los autores, a excepción del último, ajustado según pesos registrados en el presente trabajo).

Los ejemplares fueron obtenidos del suelo del predio de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República) en Montevideo, Uruguay, una semana antes del inicio de la incubación. Durante este tiempo estuvieron en aclimatación en un suelo igual al de los microcosmos (para promover la sustitución del contenido intestinal por suelo idéntico en microbioma), con 20% de humedad gravimétrica (w/w) y a 18 °C.

MICROCOSMOS EX-SITU

Adicionalmente al diseño descrito arriba, se realizó un experimento satélite que llamaremos “ex-situ”, donde se incubaron macetas adicionales para poner a prueba la relevancia de la rizodeposición vs. el tejido macroscópico de raíz en la formación de POM y MAOM (Fig. 3b). En este experimento satélite solo se utilizó únicamente la lombriz geófaga *A. caliginosa* (por ser esperable mayor interacción con la rizosfera). Consistió en 10 macetas, 5 con biomasa de vicia y 5 de avena, con suelo proveniente de macetas con plantas no marcadas (misma historia de invernáculo y manipulación que el experimento general) al que se le extrajo la raíz original y luego se le incorporaron raíces de la misma especie pero marcadas (provenientes de otras macetas); finalmente se le agregó tejido aéreo en superficie no marcado, en cantidades equivalentes al diseño general. Las restantes condiciones y manipulación de estos microcosmos fueron idénticas al diseño general (“in-situ”). Es así como en estas 10 macetas del experimento “ex-situ”, quedaron suelos con rizodeposición no marcada, proveniente de la etapa de crecimiento de las plantas en invernáculo, raíces marcadas enterradas y restos vegetales aéreos sin marcar.

MUESTREOS Y ANÁLISIS ISOTÓPICOS DE SUELO Y PLANTAS

En cada muestreo destructivo durante la etapa de incubación y descomposición, los residuos vegetales fueron removidos de la superficie, limpiados de suelo adherido (devuelto al microcosmos). El suelo fue tamizado a 2mm para extraer las lombrices y posibles cocones presentes (ambos fijados en alcohol 95% previo anestesiado de las lombrices, siguiendo a (Righi, 1990), así como las raíces y fragmentos enterrados de residuos aéreos. Los restos vegetales fueron secados a 40 °C durante 48 hs para su posterior procesamiento.

El análisis isotópico del suelo y plantas (^{13}C y %C) fue realizado mediante espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) de flujo continuo por el Stable Isotope Facility de la Universidad de California, Davis, EEUU, y las muestras preparadas según su protocolo³. Estas muestras fueron tomadas para cada microcosmos en el tiempo de su destrucción (“tiempo final”) pero los valores iniciales para suelo y plantas fueron tomados para un conjunto de microcosmos testigo, con avena o vicia, utilizados como referencia de tiempo inicial. Los valores fueron ajustados a 1500g de suelo seco, para permitir cálculos entre valores de macetas con cantidad de suelo ligeramente diferente. El fraccionamiento del suelo en MAOM y

³ <https://stableisotopefacility.ucdavis.edu/sample-preparation-carbon-and-nitrogen-solids>

POM fue realizado siguiendo el procedimiento de (Cambardella & Elliott, 1992), en el que las fracciones son separados por atravesar o no atravesar un tamiz de 53 μ , respectivamente, luego de ser sumergido y agitado por 18 hs en una solución dispersante de hexametáfosfato al 0.5%. Ambas fracciones son luego secadas en estufa a 60 °C.

CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La proporción de C proveniente de una fuente única en la totalidad del suelo (fnC_{nuevo_COS}) se calcula en base a Balesdent et al. (1987), según:

$$fnC_{nuevo_COS} = (\delta^{13}C_{COS_f} - \delta^{13}C_{COS_i}) / ((\delta^{13}C_{FUENTE} - \delta^{13}C_{COS_i})) \quad (1)$$

donde $\delta^{13}C_{COS_f}$ y $\delta^{13}C_{COS_i}$ son las señales isotópicas del COS al final e inicio del experimento, y $\delta^{13}C_{FUENTE}$ la señal isotópica de la fuente de ^{13}C (e.g. biomasa vegetal). Sin embargo, este diseño experimental utilizó dos fuentes de ^{13}C , la biomasa vegetal aérea en superficie y la raíz (y rizodeposición) enterrada, en cada caso una marcada y la otra no marcada. Entonces, la fuente es en realidad la suma de las señales isotópicas de ambas fuentes, ponderadas por la proporción que finalmente ingresó al suelo como C_{nuevo} :

$$\delta^{13}C_{FUENTE} = \delta^{13}C_{PLANTA_{aéreo}} * q_{COS} + \delta^{13}C_{PLANTA_{raíz}} * (1 - q_{COS}) \quad (2)$$

donde $\delta^{13}C_{PLANTA_{aéreo}}$ y $\delta^{13}C_{PLANTA_{raíz}}$ son las señales isotópicas del tejido aéreo y de raíz, y q_{COS} es la proporción de C_{nuevo} proveniente de tejido aéreo.

Al sustituir $\delta^{13}C_{FUENTE}$ en la ecuación 1 por la ecuación 2, la ecuación pasa a tener 2 incógnitas, fnC_{nuevo_COS} y q_{COS} , con lo que se establece un sistema de 2 ecuaciones (resueltas con la función *solve* de R (R Core Team, 2022), donde una de ellas utiliza los valores de los microcosmos con residuos aéreos marcados y raíces no marcadas (indicados por el subíndice “E/N”, por Enriquecido/No enriquecido) y la otra los valores de los microcosmos complementarios (subíndice “N/E”):

$$fnC_{nuevo_COS} = (\delta^{13}C_{COS_f_{E/N}} - \delta^{13}C_{COS_i_{E/N}}) / ((\delta^{13}C_{PLANTA_{aéreo_E/N}} * q_{COS}) + (\delta^{13}C_{PLANTA_{raíz_E/N}} * (1 - q_{COS})) - \delta^{13}C_{COS_i_{E/N}}) \quad (3)$$

$$fnC_{nuevo_COS} = (\delta^{13}C_{COS_f_{N/E}} - \delta^{13}C_{COS_i_{N/E}}) / ((\delta^{13}C_{PLANTA_{aéreo_N/E}} * q_{COS}) + (\delta^{13}C_{PLANTA_{raíz_N/E}} * (1 - q_{COS})) - \delta^{13}C_{COS_i_{N/E}}) \quad (4)$$

Para resolver este sistema de ecuaciones, se utilizaron los valores promedio de las cinco repeticiones de cada tratamiento de $\delta^{13}\text{C}$ y suelos finales ($\delta^{13}\text{C_COS_f}$) al tiempo T_2 , y los mismo con los valores de plantas (aéreo o raíz), armando un sistema de dos ecuaciones único para vicia y otro para avena. La varianza y los errores en la estimación de fnCnuevo_COS fueron estimados como se detalla más adelante. A su vez, para resolver estos sistemas de ecuaciones se utilizan los valores del tiempo inicial ($\delta^{13}\text{C_COS_i}$) de cada tratamiento previo al inicio de la incubación, y para esto utilizamos los valores isotópicos mínimos iniciales de $\delta^{13}\text{C_COS_i}$ en el tiempo inicial del experimento (T_0). Esto fue así para avena, pero debido a que el marcado isotópico del suelo en T_0 presentó errores para vicia, se realizó una estimación del valor inicial de $\delta^{13}\text{C_COS_i}$ en T_0 a partir de los valores de la maceta control sin lombrices en T_1 , dando coherencia a las estimaciones de C_{nuevo} a partir de la vicia, pero posiblemente subestimando levemente las mismas (ya que la diferencia entre los valores de $\delta^{13}\text{C_COS}$ entre T_0 y T_2 , suponemos que sea mayor que entre T_1 y T_2). El uso de los valores iniciales de $\delta^{13}\text{C_COS_i}$ en vicia de T_1 en vez de T_0 , no altera las comparaciones entre tratamientos ya que se utiliza el mismo valor inicial para todos ellos. En otras palabras, como los análisis estadísticos de comparación de C_{nuevo} entre tratamientos fueron hechos sobre las diferencias absolutas entre control y los tratamientos con lombrices, estos no se ven alterados por los valores iniciales de $\delta^{13}\text{C_COS_i}$.

Para la estimación de desvíos estándar para ambas variables de interés (fnCnuevo_COS y q_{COS}), se implementó un cálculo de propagación de errores numérico, dada la complejidad de la aproximación analítica. Para esto, las variables de este sistema de ecuaciones fueron tomadas como variables aleatorias, con las medias explicitadas anteriormente y desvíos estándar correspondientes, y su solución fue calculada 10.000 veces, permitiendo el cálculo de desvíos estándar para cada caso.

Las fórmulas 3 y 4 presentadas anteriormente fueron utilizadas para estimar el COS nuevo total, y fueron adaptadas para la estimación de la fracción POM. La proporción de C proveniente de las plantas (C_{nuevo}) que se almacenó en la POM fue calculada con las mismas ecuaciones 3 y 4 pero utilizando los valores medidos para la fracción POM:

$$\text{fnCnuevo_POM} = (\delta^{13}\text{C_POM_f}_{\text{E/N}} - \delta^{13}\text{C_POM_i}_{\text{E/N}}) / ((\delta^{13}\text{C_PLANTA}_{\text{aéreo_E/N}} * q_{\text{POM}}) + (\delta^{13}\text{C_PLANTA}_{\text{raíz_E/N}} * (1 - q_{\text{POM}})) - \delta^{13}\text{C_POM_i}_{\text{E/N}}) \quad (5)$$

$$\text{fnCnuevo_POM} = (\delta^{13}\text{C_POM_f}_{\text{N/E}} - \delta^{13}\text{C_POM_i}_{\text{N/E}}) / ((\delta^{13}\text{C_PLANTA}_{\text{aéreo_N/E}} * q_{\text{POM}}) + (\delta^{13}\text{C_PLANTA}_{\text{raíz_N/E}} * (1 - q_{\text{POM}})) - \delta^{13}\text{C_POM_i}_{\text{N/E}}) \quad (6)$$

Así, los sistemas de ecuaciones 3-4 y 5-6 permitieron estimar un valor de proporción de C_{nuevo} (en COS o POM) para cada tratamiento y tiempo, y el desvío estándar asociado.

Luego, a partir de estos, se estimó el C_{nuevo} promedio que ingresó al COS total (C_{nuevo_COS}) en cada tratamiento y tiempo:

$$C_{nuevo_COS} = f_n C_{nuevo_COS} * C_{COS_f} \quad (7)$$

y el C_{nuevo} promedio que ingresó a POM (C_{nuevo_POM}):

$$C_{nuevo_POM} = f_n C_{nuevo_POM} * C_{POM_f} \quad (8)$$

donde C_{COS_f} y C_{POM_f} son las concentraciones de C (mgC/g suelo seco) promedio en COS y POM al momento del muestreo (T_1 o T_2) en cada tratamiento.

Seguidamente, a partir de las ecuaciones 7 y 8 se obtuvo el C_{nuevo} promedio en MAOM (C_{nuevo_MAOM}):

$$C_{nuevo_MAOM} = C_{nuevo_COS} - C_{nuevo_POM} \quad (9)$$

El C_{nuevo} de COS, POM o MAOM proveniente de tejido aéreo o de raíz se calculó multiplicando el valor de C_{nuevo} de cada fracción por la proporción de aéreo (q) o raíz (1-q) correspondiente, estimadas anteriormente. Asimismo, en base a Piñeiro et al. (2010) también se calculó la cantidad de POM que se transformó en MAOM ($C_{MAOM_{nuevo} desde POM}$) durante el periodo de la incubación, mediante la siguiente ecuación:

$$C_{MAOM_{nuevo} desde POM} = (C_{nuevo_MAOM} * (\delta^{13}C_{MAOM_iN/E} - \delta^{13}C_{FUENTE_{N/E}}) + C_{MAOM_f_{N/E}} * (\delta^{13}C_{MAOM_f_{N/E}} - \delta^{13}C_{MAOM_iN/E})) / (\delta^{13}C_{POM_iN/E} - \delta^{13}C_{MAOM_iN/E}) \quad (10)$$

donde C_{MAOM_f} es el contenido de C en MAOM al final del experimento. Finalmente, el $C_{original_remanente}$ presente en cada fracción de suelo al final de las incubaciones (i.e. la porción del el C inicial que permaneció en la fracción desde el T_0 hasta el momento del muestreo) fue calculado como:

$$C_{original_remanente_COS} = C_{COS_f} - C_{nuevo_COS} \quad (11)$$

$$C_{original_remanente_POM} = C_{POM_f} - C_{nuevo_POM} \quad (12)$$

$$C_{original_remanente_MAOM} = C_{MAOM_f} - C_{nuevo_POM} - C_{MAOM_{nuevo} desde POM}, \quad (13)$$

El cálculo de desvío estándar para cada estimación siguió las reglas de propagación para errores independientes y se resume en la Tabla A1, junto a los análisis estadísticos utilizados.

Se utilizaron modelos lineales mixtos (y test de Tukey a posteriori, $\alpha = 0.05$) para las comparaciones entre tratamientos (y fracciones del suelo) del stock de COS total (con el factor binario “marcado” como variable aleatoria) y de las señales isotópicas de ^{13}C (con el factor “tiempo” como variable aleatoria). A diferencia de estas variables, para las que se tiene un valor medido para cada maceta, las restantes variables (ecuaciones 7 a 13) cuentan únicamente con un valor promedio y desvío estándar para cada tratamiento, tiempo y fracción del suelo. Esto inhabilita el uso de modelos lineales mixtos, por lo que las comparaciones de los tratamientos de lombriz contra el control correspondiente fueron realizadas mediante el Test de Dunnett (Dunnett, 1955).

Al momento del muestreo (T_1 o T_2) en total siete macetas presentaron lombrices muertas, por lo que no fueron utilizadas en los análisis. Asimismo, para calcular la pérdida de peso en las lombrices durante la incubación, fueron excluidos los ejemplares de las 11 macetas que presentaron cocones al momento del muestreo, para evitar sesgos por pérdida de peso relacionada a la reproducción. Únicamente *L. friendi* mostró producción de cocones (entre 1 y 12 por microcosmos) y solo en T_2 .

RESULTADOS

Los resultados muestran que los efectos de las lombrices en la dinámica del carbono en el suelo variaron según la especie de planta (avena o vicia) presente como residuos en descomposición. En términos generales, la incorporación de C_{nuevo} al suelo fue mayor con vicia, pero en estas macetas también se descompuso más el carbono original ($C_{\text{original_remanente}}$, presente en el suelo al inicio del experimento) en ambas las fracciones. Ambas especies de lombriz alteraron estos patrones generales de forma diferente, como se describe más adelante. El origen del C incorporado (desde tejido aéreo o raíz y rizodeposición) a las fracciones de suelo evaluadas (POM y MAOM), también varió entre avena y vicia, y fue afectado diferencialmente por la presencia de las lombrices. En el tiempo inicial (T_0) los microcosmos con avena o vicia presentaron valores similares de calidad y cantidad de MOS (C:N= 10.4 vs. 10.3; %C= 1.25 vs. 1.27), pero el diseño experimental impuso diferencias sustanciales en la cantidad y calidad del residuo de avena o vicia agregado al inicio de la etapa de incubación (0.78 gC/g_{suelo_seco} vs. 0.38 gC/g_{suelo_seco}; C:N= 28 vs. 15). Es importante marcar que al inicio de la incubación es probable que parte del C presente en el suelo proviniera de la rizodeposición de los cultivos que crecieron previamente en la maceta.

Los microcosmos con lombrices presentaron igual o mayor cantidad de C_{nuevo} incorporado a la POM y a la MAOM, en comparación con los controles, tanto desde residuos aéreos como desde los subterráneos y para ambas especies de plantas (Fig. 4). El tamaño del efecto de las lombrices en la entrada de C_{nuevo} (i.e. diferencia tratamiento-control) fue mayor en la MAOM que en la POM (Fig. 4 y Fig. A1). Las lombrices aumentaron la incorporación de C_{nuevo} en mayor magnitud desde los residuos de leguminosa que desde los de gramínea. En el caso de la vicia, ambas lombrices aumentaron la incorporación de carbono al suelo (C_{nuevo}) tanto desde la biomasa subterránea (raíces y rizodeposición) como de la biomasa aérea y en ambas fracciones (POM y MAOM). Por el contrario, para la avena solo la lombriz anécica (*L. friendi*) aumentó la incorporación de C_{nuevo} al suelo, y lo hizo solamente desde la biomasa aérea pero para ambas fracciones de la materia orgánica del suelo (Fig. 4).

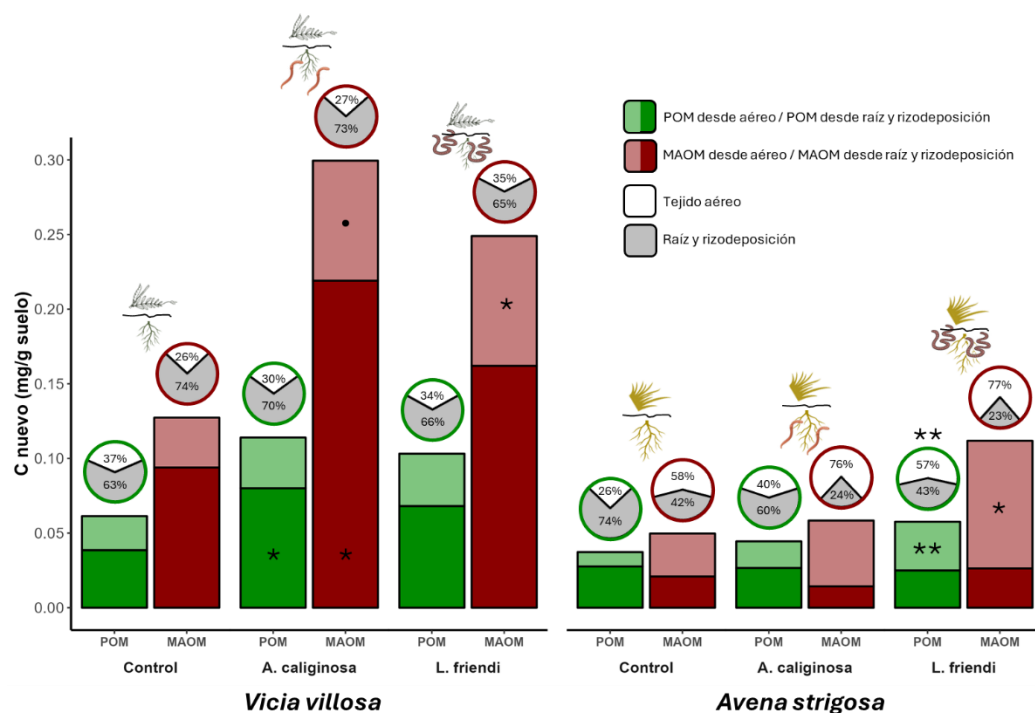


Figura 4. Cantidad de carbono nuevo (mg/g de suelo) incorporado en cada tratamiento (control y con dos tipos de lombrices), desde residuos aéreos o subterráneos (raíces + rizodeposición) de vicia (izquierda) o avena (derecha), en las fracciones POM o MAOM al término del experimento (40 días de incubación). A su vez, los gráficos de tortas muestran las proporciones de carbono incorporados a cada fracción de la materia orgánica del suelo desde residuos aéreos (blanco) o subterráneos (gris). **: diferencia con el control significativa con $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; •: $p < 0.10$ (test de Dunnett).

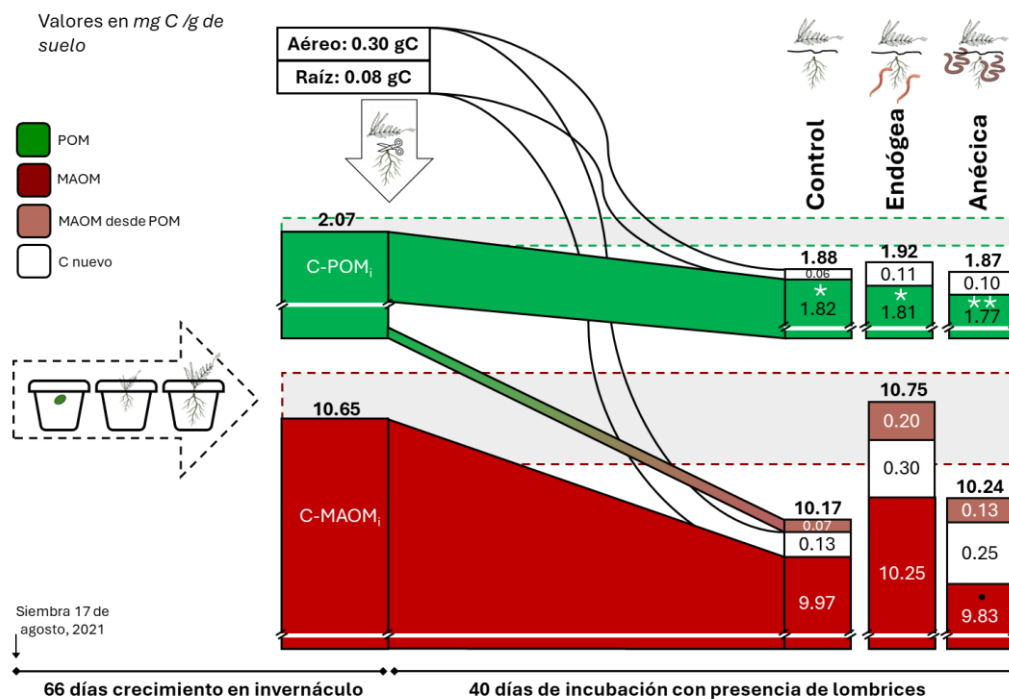
Por su parte, en el experimento satélite “*ex-situ*”, donde la única fuente de tejido marcado en ^{13}C fueron tejidos radicales macroscópicos pero no de rizodeposición, no se observó incorporación significativa de C_{nuevo} y los valores de ^{13}C alcanzados luego de 40 días de incubación fueron incluso menores a los del control sin lombrices (Fig. A3). Esta observación muestra que la mayoría del C_{nuevo} incorporado desde los residuos de vicia al suelo por la lombriz *A. caliginosa* provenían de la rizodeposición de la vicia y fueron incorporados a la fracción MAOM. Como se mostró anteriormente, en las macetas con vicia y en presencia de la lombriz endógena, los aumentos más importantes en C_{nuevo} respecto al control se observaron desde los tejidos subterráneos hacia POM y MAOM, y en menor medida y significancia desde tejidos aéreos hacia MAOM (Fig. 4).

Las lombrices no solo afectaron la incorporación de C_{nuevo} al suelo, sino que también afectaron la conservación del $\text{C}_{\text{original_remanente}}$, luego de 40 días de descomposición, dependiendo de la especie de planta considerada (Fig. 5). En el caso de la vicia, luego de 40 días de

descomposición, se observó una tendencia de disminución del $C_{original_remanente}$, tanto para la POM como para la MAOM, en los tratamientos control y con *L. friendi* (Fig. 5a). Por el contrario, la lombriz endógea (*A. caliginosa*) logró mantener el $C_{original_remanente}$ en la MAOM ($p < 0.05$, Tabla A1), lo cual sumado a la alta incorporación de C_{nuevo} explican el mantenimiento observado en los niveles de *stock de COS* total respecto al inicio de la incubación, mientras que los microcosmos con *L. friendi* y control muestran una reducción del *stock de COS* (Fig. 4 y Fig. A2). En otras palabras, en los tratamientos con vicia la acción de la lombriz endógea evitó una disminución de COS en base al mantenimiento de MAOM original y a la mayor incorporación y/o mantenimiento de C desde residuos vegetales a la POM (23% del C nuevo) y MAOM (77% del C_{nuevo}).

Por otro lado, en las macetas con avena no se observó una disminución importante del $C_{original_remanente}$ en la MAOM en ninguno de los tratamientos como en el caso de la vicia, pero sí disminuyeron los valores de $C_{original_remanente}$ en la POM en el control y en presencia de *A. caliginosa* (Fig. 5b). Como se mencionó anteriormente, con residuos de avena de alta C:N, la lombriz anécica logró una alta incorporación de C_{nuevo} desde tejidos aéreos, en POM y MAOM (Fig. 4). Esto, junto al mantenimiento del $C_{original_remanente}$ (Fig. 5b), redundó en un aumento en el *stock de COS* total al finalizar la incubación (Fig. A2). Cabe aclarar que, si bien el $C_{original_remanente}$ en MAOM no varió significativamente entre tratamientos, parece observarse una tendencia a una mayor conservación con la lombriz anécica, luego con la endógea y por último en el control (Fig. 5b).

a) *Vicia villosa*



b) *Avena strigosa*

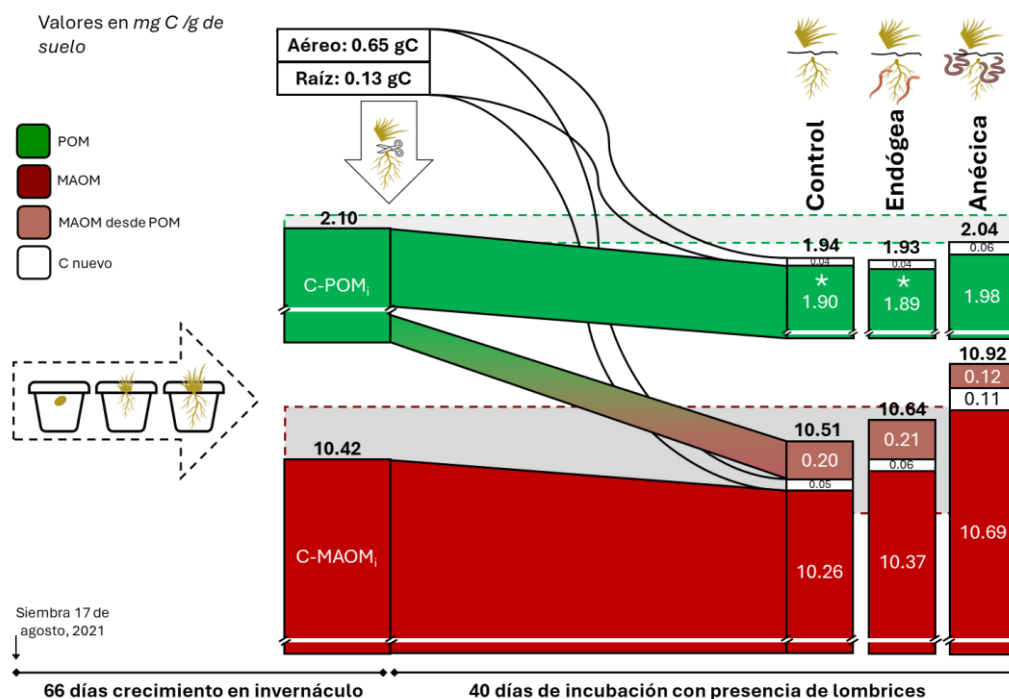


Figura 5. Stocks de carbono obtenidos al inicio (T₀) y final del experimento (T₂, 40 días) para materia orgánica particulada (POM) y materia orgánica asociada a minerales (MAOM) en los diferentes tratamientos, para vicia (a) y avena (b). Los flujos cruzados de POM a MAOM representan carbono movido de POM inicial a MAOM final. Las bandas grises con borde punteado representan errores estándar correspondientes al stock de C inicial (T₀). Nótese el corte de escala en los ejes verticales, simbolizado con una línea blanca.

Como resumen general, observamos que las lombrices aumentaron la incorporación de C_{nuevo} en ambas fracciones POM y MAOM o lo mantuvieron igual al control, pero nunca lo disminuyeron (Fig. 6). El aumento en la incorporación de C_{nuevo} fue de 87 y 95% con respecto al control, para la lombriz anécica *L. friendi*, en las macetas de vicia y avena, respectivamente (Fig. 6), mientras que la endógena *A. caliginosa* aumentó la incorporación de C_{nuevo} en un 119% con respecto al control únicamente en las macetas con vicia (Fig. 6). Adicionalmente, la lombriz anécica tuvo un efecto más importante en las macetas con avena, aumentando el C total del suelo, principalmente por una incorporación del C_{nuevo} desde residuos aéreos y por la conservación del $C_{original_remanente}$, tanto en POM como en MAOM. La lombriz endógena, en cambio, tuvo un efecto más importante en las macetas con vicia, manteniendo el $C_{original_remanente}$ en la MAOM y aumentando la incorporación de C_{nuevo} subterráneo en ambas fracciones del suelo, pero principalmente de la rizodeposición a la MAOM.

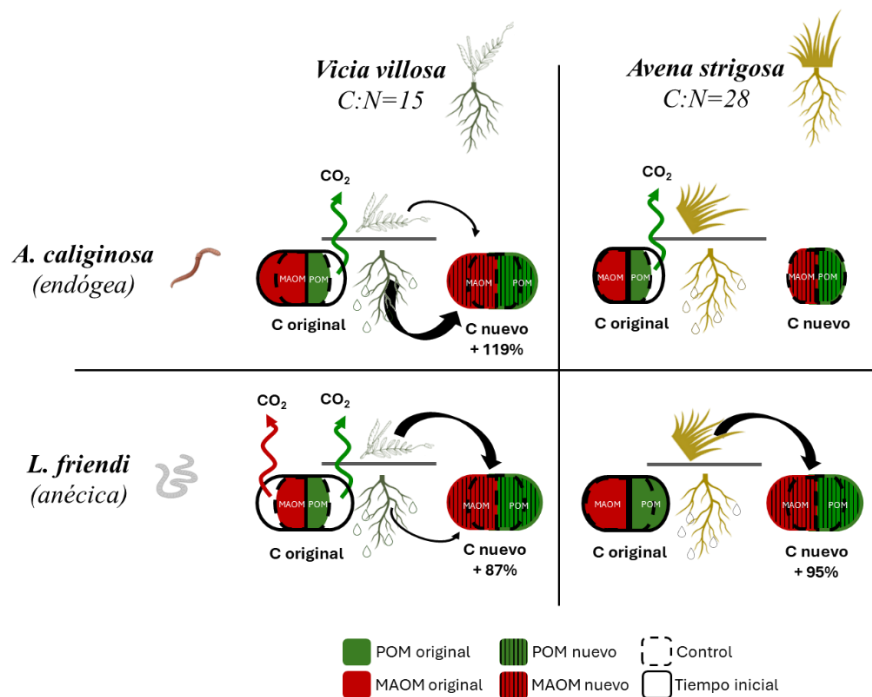


Figura 6. Resumen gráfico de los resultados generales. Se representan cualitativamente los efectos de ambas lombrices sobre el C_{nuevo} (óvalos rayados) y el $C_{original_remanente}$ (óvalos sin rayar), en relación a los respectivos controles (no mostrados). Las flechas negras indican un efecto más claro (gruesa) o menos (fina) en la incorporación de C_{nuevo} a la POM y MAOM desde residuos aéreos o de raíz y rizodeposición. Las flechas señaladas con " CO_2 " indican pérdidas de C en cada fracción del suelo atribuidas a la mineralización del $C_{original}$.

DISCUSIÓN

La actividad de las lombrices evitó la pérdida y/o favoreció el aumento del *stock de COS* en el suelo a través de al menos dos mecanismos: 1) el aumento en la incorporación de C_{nuevo} desde residuos vegetales; 2) el mantenimiento del $C_{\text{original_remanente}}$. En línea con la hipótesis planteada y trabajos anteriores, estos efectos variaron según las diferentes fracciones del suelo POM y MAOM (Angst et al., 2024), y dependieron de la especie de lombriz (de hábitos alimenticios marcadamente diferentes; Bossuyt et al., 2006; Gilbert et al., 2014; J. Huang et al., 2015), de las plantas presentes (de calidades contrastantes; Al-Maliki & Scullion, 2013) y del origen del C (proveniente de tejido aéreo en superficie o de raíz y rizodeposición generadas in-situ; Angst et al., 2020; Vidal et al., 2017, 2019). Si bien existe una gran cantidad de trabajos que reportan el efecto de las lombrices en la incorporación de C al suelo en diferentes tamaños de agregados, son escasos los que cuantifican el efecto diferenciando entre las fracciones POM y MAOM (e.g. Barthod et al., 2020; Vidal et al., 2019; Zheng et al., 2018). Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que cuantifica el efecto de lombrices endógeas y anécicas sobre la incorporación de C a POM y MAOM a nivel del total de suelo del microcosmos. Interesantemente, el diseño experimental utilizado permitió observar que, en promedio, el efecto de las lombrices (i.e. aumento de incorporación de C_{nuevo} respecto al control) se explicó en un 75% por la entrada de C hacia MAOM y el restante 25% hacia POM y que existe una fuerte interacción con el origen del C (i.e. calidad y ubicación del residuo vegetal incorporado al suelo).

Los resultados muestran diferentes efectos sobre la dinámica del C asociados a los hábitos alimenticios de las lombrices. La especie endógea, de hábitos geófagos, evitó la pérdida de COS por aumentar la entrada y/o reducir la salida de C_{nuevo} y $C_{\text{original_remanente}}$, ya en contacto con el suelo (i.e. raíz o lixiviado de residuos aéreos), y la anécica, saprófaga, aumentó el COS al promover contacto del C del tejido vegetal aéreo con el suelo por enterramiento o mezclado del residuo con las deyecciones (incorporación indirecta según Vidal et al. 2017). Estas diferencias funcionales quedan aún más en evidencia al considerar el efecto relativo a la biomasa de lombriz presente en el microcosmos. Por ejemplo, en presencia de vicia la especie endógea mostró un tamaño de efecto (diferencia con el control) de incorporación de C_{nuevo} cinco veces mayor que el de la anécica ($0.23 \text{ mgC/g}_{\text{lombriz.fresca}}$ vs. $0.04 \text{ mgC/g}_{\text{lombriz.fresca}}$). Por el contrario, en las macetas con avena con residuos de baja calidad, únicamente la lombriz anécica aumentó la incorporación de C_{nuevo} ($0.02 \text{ mgC/g}_{\text{lombriz.fresca}}$). A su vez, en el tratamiento con vicia donde las macetas control tendieron a perder $C_{\text{original_remanente}}$ en POM y MAOM, las

lombrices mostraron efectos cualitativamente contrapuestos en la MAOM: la endógea evitando la disminución y la anécica aumentándola. A su vez, la rizodeposición parece ser la fuente de C clave en el efecto de la lombriz *A. caliginosa* y no el tejido macroscópico de raíz, lo que trae importantes implicancias ecológicas y metodológicas, discutidas más abajo. Según nuestro conocimiento esta observación no ha sido registrada anteriormente, ni las interacciones entre estos factores han sido puestas a prueba a la vez.

Las condiciones presentes en los microcosmos con avena o vicia pueden haber alterado diferencialmente el efecto de cada especie de lombriz sobre el C, e.g. debido a las características diferentes de la MOS inicial (Curry & Schmidt, 2007), del residuo vegetal presente (Coq et al., 2007) y/o de la comunidad microbiana presente (Brown & Doube, 2004). Debido a las diferencias en la calidad de tejidos vegetales y a la rizodeposición aportada por los cultivos, es esperable que los microcosmos con vicia o avena hayan presentado comunidades diferentes de microorganismos (e.g. en composición, abundancia, tasa metabólica y/o actividad enzimática). Considerando esto, las diferencias observadas entre plantas del efecto de cada lombriz pueden asociarse a los siguientes dos escenarios, no excluyentes: 1) el comportamiento de la lombriz es diferente entre tratamientos con avena o vicia, y 2) la acción de las lombrices genera efectos diferentes sobre el COS debido a las diferencias en los microcosmos.

Respecto al primer escenario, es probable que la palatabilidad de ambas especies de plantas sea diferente para las lombrices y haya generado parte de la diferencia observada en los efectos sobre la dinámica del C. La relación C:N de la avena es casi el doble que la de la vicia y que la del suelo (de C:N= 10), y esto para la lombriz geófaga (meso o polihúmica; Rätty, 2004; Szlavecz et al., 2018) puede que implique que su rizosfera no sea más atractiva que el resto del suelo, reduciendo la interacción con el C de la rizosfera y entonces el efecto de protección del C en agregados. Por otro lado, la especie saprófaga se ve obligada a consumir el tejido vegetal en superficie de ambas especies de plantas, puesto que no cuentan con una fuente de alimento de mejor calidad. Esta explicación es consistente con el hecho de que la pérdida de peso observada en las lombrices al final de la incubación, usual en este tipo de experimentos (Fründ et al., 2010; Marhan et al., 2007), fue muy alta en los tratamientos con avena (-20% la geófaga y -39% la saprófaga, relativo a valores de pérdida de peso recomendados (Fründ et al., 2010) y menores en los tratamientos con vicia (-10% la geófaga y -12% la saprófaga; $p=0.001$; $p=0.03$). Esto se dio incluso a pesar de que los tratamientos con avena contaron con casi el doble de biomasa vegetal seca incorporada, sugiriendo una menor preferencia por este tejido. Algunos ejemplares fueron encontrados en dormancia al momento del muestreo de los microcosmos,

pero estas observaciones no mostraron un patrón claro e informativo como proxy de la actividad de las lombrices (e.g. cambios fisiológicos según (Bayley et al., 2010)). La cantidad de las fuentes de alimento (C contenido en biomasa o en la rizosfera como rizodeposición) se espera que tenga una relación negativa con la alimentación de las lombrices, particularmente para las geófagas (Capowiez et al., 2024; Curry & Schmidt, 2007; Le Couteulx et al., 2015): a mayor disponibilidad y concentración de C, menor necesidad de ingestión de suelo. Sin embargo, la pérdida de peso para ambas lombrices fue mayor en los tratamientos con avena (más biomasa vegetal), subrayando la relevancia de la calidad (palatabilidad) de la biomasa y no tanto de la cantidad.

Respecto al segundo escenario, las diferencias en los microcosmos de avena y vicia podrían estar dando lugar a efectos diferentes sobre la dinámica del C, según la especie de lombriz, debido a i) promoción diferencial del efecto priming (Marhan et al., 2007; Zheng et al., 2018); ii) pérdidas diferentes por lixiviado (por diferente eficiencia de la vía de “direct sorption” según la abundancia microbiana, composición química de la materia orgánica disuelta (Sokol, Sanderman, et al., 2019) y/o diferente drilósfera (Hoang et al., 2016) y vías de infiltración de agua (Hallam et al., 2020; Hallam & Hodson, 2020); iii) diferente relación C:N del tejido o la materia orgánica disuelta (Cheng et al., 2023; Zheng et al., 2018); iv) una dinámica temporal diferente del efecto, i.e. el efecto de la lombriz es igual pero más lento en presencia de una planta y otra.

Si bien la identificación de priming (i) por adición de residuos vegetales no es posible con este diseño experimental (por falta de un tratamiento control sin agregado de residuos vegetales ni lombrices), los datos sí permiten descartar la explicación de un priming diferente entre ambas especies debido a la acción de las lombrices, porque en ningún caso el stock de $C_{original_remanente}$ en los tratamientos con lombriz fue significativamente menor que el del control (en avena incluso ninguno fue menor que el inicial). De haber existido priming (no en avena, pero posiblemente algo en vicia), esto no parece deberse a la especie de lombriz presente, sino al resto de los descomponedores. Las pérdidas por lixiviado (ii) quedan descartadas porque el agua escurrida al regar fue reintroducida a los microcosmos. La tercera explicación (iii) es factible puesto que la relación C:N determina la tasa de descomposición de la materia orgánica y la formación de MAOM (Angst et al., 2021; Cheng et al., 2023) y esto puede haber promovido una mayor retención de C_{nuevo} en vicia que en avena, como observamos para ambas lombrices. Finalmente, aunque no es posible evaluarlo en este caso, podría ocurrir que la dinámica temporal (iv) de los efectos de las lombrices fuese más lenta en presencia de avena que de vicia, e.g. debido a concentraciones mayores de sustancias menos palatables o de

descomposición lenta, como observaron Vidal et al. (2019). Esto sugeriría que las diferencias registradas se deben a la duración del experimento (i.e. con más tiempo de incubación los efectos finales de cada lombriz podrían ser similares para ambas plantas).

Como se planteó inicialmente, los hábitos alimenticios de las lombrices y el origen del C explican su destino a las distintas fracciones del suelo. Las observaciones sugieren que el destino del C_{nuevo} a POM o MAOM depende de la interacción entre el origen del C (i.e. biomasa aérea en superficie o raíz enterrada) y los hábitos alimenticios de las lombrices, apoyando la hipótesis planteada. En este sentido, se esperaba que la lombriz geófaga favoreciera el mantenimiento del *stock de COS* inicial, como fue observado en nuestro experimento, probablemente debido a la protección física del C en micro y macroagregados generados durante la alimentación o secreción de mucosas cutáneas (Bossuyt et al., 2004, 2005, 2006; Guhra et al., 2020) y/o a la estimulación de la microbiota y consecuente llegada del C a fracciones más estables del suelo, i.e. MAOM (Angst et al., 2019), pero no a un posible enterramiento del tejido ubicado en superficie (como si era esperable para la especie anécica). Por otro lado, y como era esperable para la segunda especie, la lombriz anécica en presencia de residuos de avena produjo un aumento del COS respecto al tiempo inicial debido a la incorporación de C desde tejidos aéreos ubicados en superficie. En los controles, sin la acción de enterramiento dado por esta lombriz (o incorporación indirecta por mezcla en superficie con las deyecciones; Vidal et al. 2017), este C no cuenta con otra vía de transferencia al suelo más que el limitado contacto directo de las hojas con el suelo y de la lixiviación del C, dependiente de los eventos de riego para su arrastre. Este efecto se asocia en parte a un cambio, dado por la lombriz, en el punto de entrada al suelo del C vegetal, determinante para la formación de MOS (Sokol, Sanderman, et al., 2019).

Los resultados observados sugieren que los diferentes hábitos alimenticios de las lombrices fomenten distintas vías de llegada de C desde las plantas al suelo (e.g. vía in-vivo o “direct sorption”). Considerando únicamente la interacción con la biomasa muerta (y no sobre el desarrollo en vida de la planta), los resultados observados en la lombriz endógea sugieren que esta fomenta la vía in-vivo de formación del C_{nuevo} por aumento de la protección del C de necromasa microbiana en MAOM (Angst et al., 2019) debido a: i) la mezcla del C de rizodeposición (raíces finas y DOM) con microorganismos y el aumento de la actividad microbiana dentro de las deyecciones jóvenes (Scheu, 1987); y ii) la redistribución espacial de la comunidad microbiana, reduciendo la proporción del suelo con baja colonización microbiana (Hoang et al., 2016). Los resultados también apoyan la idea de que la lombriz endógea fomente la vía por “direct sorption” por proteger C de DOM (y eventualmente del tejido de raíz, y en

menor medida aéreo) en agregados, antes de que los microorganismos lo accedan. Por otro lado, aunque puede fomentar la vía in-vivo (Vidal et al., 2017), nuestros resultados sugieren que la saprófaga aumenta en mayor medida la vía de “direct sorption” para residuos vegetales en superficie (y entonces la cantidad de C derivado de planta vs. C de microorganismos), por aumento del contacto directo del tejido vegetal con el suelo por enterramiento del mismo o al mezclarlo en la superficie con las deyecciones (Vidal et al., 2017), ambas situaciones observadas en estos microcosmos. Esto puede implicar que comunidades de lombrices predominantemente anécicas saprófagas tengan mayor efecto de incorporación de C en zonas del suelo en donde se espera que la vía de “direct sorption” tenga mayor influencia en la estabilización del COS, e.g. en zonas con menor biomasa y actividad microbiana (particularmente de bacterias), que se espera sean más comunes en suelos agrícolas con bajo volumen de rizosfera (Sokol, Sanderman, et al., 2019). Por el contrario, comunidades dominadas por lombrices endógeas tendrán probablemente un mayor potencial de efecto en zonas de rizosfera con comunidades microbianas más abundantes, debido a que aceleran la protección física del C de la planta o de necromasa de microorganismos, antes de que sea mineralizado por éstos. Estas hipótesis son particularmente interesantes para el entendimiento de los roles funcionales de las lombrices sobre la dinámica del C en el suelo.

Los resultados del experimento satélite “ex-situ” sugieren fuertemente que el aumento en C_{nuevo} originado en raíz proviene casi únicamente de la rizodeposición y no del tejido macroscópico de raíz (Sokol, Kuebbing, et al., 2019). Hasta donde sabemos, si bien diversos estudios testearon y registraron efectos de incorporación de C por lombrices desde raíces de forma global o desde rizodeposición (Zhu et al., 2021), no ha sido documentada la observación de que el C nuevo incorporado por una lombriz provenga principalmente de la rizodeposición y no del tejido macroscópico de la raíz. Esta observación, alineada con la sugerencia de que las lombrices utilizan C contenido en estructuras órgano-minerales de pequeño tamaño (Ferlian et al., 2014), es particularmente relevante en términos ecológicos y metodológicos. En el sentido ecológico, muestra que el efecto de las lombrices geófagas sobre la incorporación de C desde el tejido subterráneo de plantas puede depender de la proporción rizodeposición:raíz de la planta (y su palatabilidad), y no tanto de la biomasa macroscópica de raíz. Esto cobra particular relevancia al considerar que el C de la rizodeposición en leguminosas como *Vicia sativa* puede ser 12 veces mayor que el de raíces (Berenstecher et al., 2023) y, más aún, que su eficiencia de formación de COS es sustancialmente mayor (e.g. 2 a 13 veces) que la del tejido macroscópico de raíz o aéreo (Sokol, Kuebbing, et al., 2019). Esta observación podría ser puesta a prueba como hipótesis, para entender mejor con qué tipos de lombrices y en qué condiciones

ambientales debemos esperar efectos de balance de COS positivos, neutros o negativos, pregunta clave que aún requiere clarificación (Angst et al., 2024; W. Huang et al., 2020; Thomas et al., 2020). En el sentido metodológico, esta observación sugiere que en los experimentos para estudiar el efecto de las lombrices sobre la dinámica del COS en los que se adiciona biomasa vegetal *ex-situ* al suelo, i.e. sin rizodeposición (que son una proporción muy importante, si no la gran mayoría), se está perdiendo y subestimando gran parte del potencial efecto de las lombrices geófagas, al menos de *A. caliginosa*, una de las especies más utilizadas en este tipo de experimentos (Bedano et al., 2019).

CONCLUSIONES

En este trabajo observamos cómo el destino del C desde la biomasa vegetal a distintas fracciones del suelo depende fuertemente de las especies de lombriz y de planta, así como del tipo y origen del tejido vegetal en descomposición. Este experimento permitió describir y cuantificar cómo los hábitos alimenticios de las lombrices definen su impacto en la dinámica del carbono en el suelo, en base a 2 mecanismos no excluyentes: incorporación de C nuevo (asociado a ambas lombrices) y mantenimiento de C original y nuevo (asociado principalmente a la especie geófaga) y cómo estos mecanismos varían según la calidad del residuo vegetal presente y su ubicación (aéreo o subterráneo). A su vez, los resultados sugieren que los efectos de algunas lombrices pueden depender de la rizodeposición y no del tejido macroscópico de raíz. Así, la relación C raíz: C rizodeposición puede ser clave para entender los efectos de estos animales sobre la dinámica del COS, algo que según conocemos no ha sido puesto a prueba y constituye una hipótesis novedosa y relevante para futuras investigaciones. La interacción entre los rasgos funcionales de las lombrices y los residuos vegetales y su repercusión en la dinámica del carbono es central para comprender el efecto de las lombrices en el funcionamiento del ecosistema. Sería muy interesante que trabajos futuros evalúen los efectos encontrados en esta tesis para otras especies de plantas y lombrices.

ANEXO (CAPITULO 3)

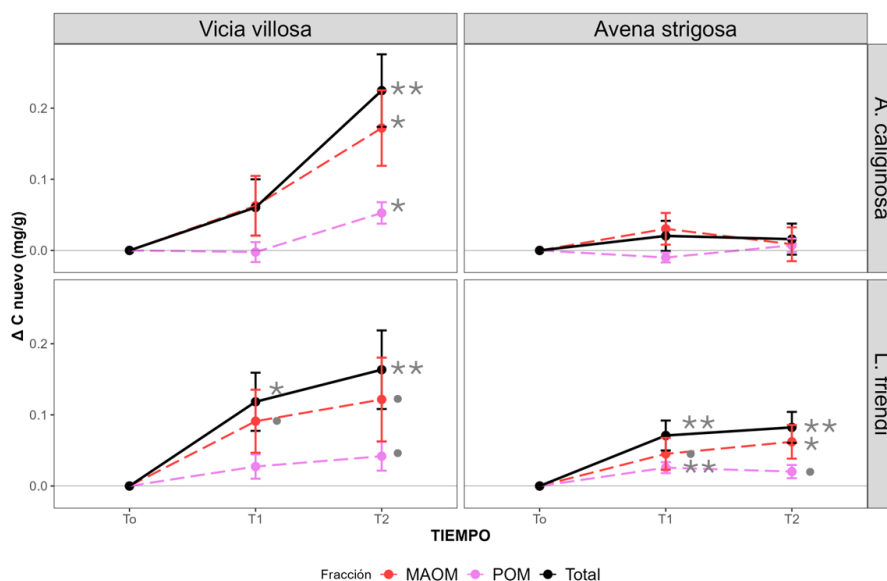


Figura A1. Efecto de la lombriz anéctica (arriba) y endógea (abajo) sobre la incorporación de C desde residuos vegetales de gramínea (izquierda) y leguminosa (derecha) a las fracciones del suelo MAOM (rojo) y POM (rosado) y al total (negro). Los valores corresponden a la diferencia de incorporación de C (mg C/g de suelo seco) en cada tratamiento respecto a su control. Nótese que un valor de cero indica que no hay efecto de la lombriz (i.e. sin diferencia con el control) y no que la incorporación de C sea nula. Las barras verticales muestran el error estándar. T₀: Día 0 de la incubación; T₁: 20 días; T₂: 40 días. **: diferencia con el control significativa con $p < 0.01$; *: $p < 0.05$; •: $p < 0.10$ (test de Dunnett).

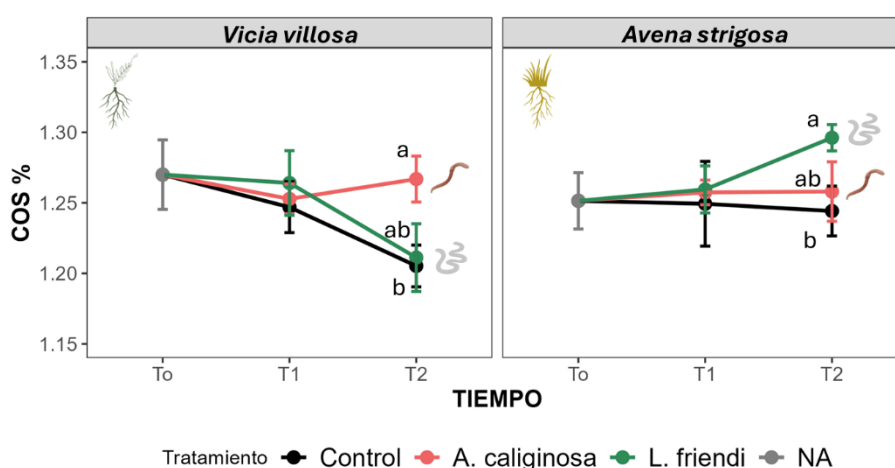


Figura A2. Porcentaje de carbono orgánico del suelo (COS %) para cada tratamiento durante los 40 días de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$, test de Tukey). Las barras verticales muestran el error estándar. T₀: Día 0 de la incubación; T₁: 20 días; T₂: 40 días.

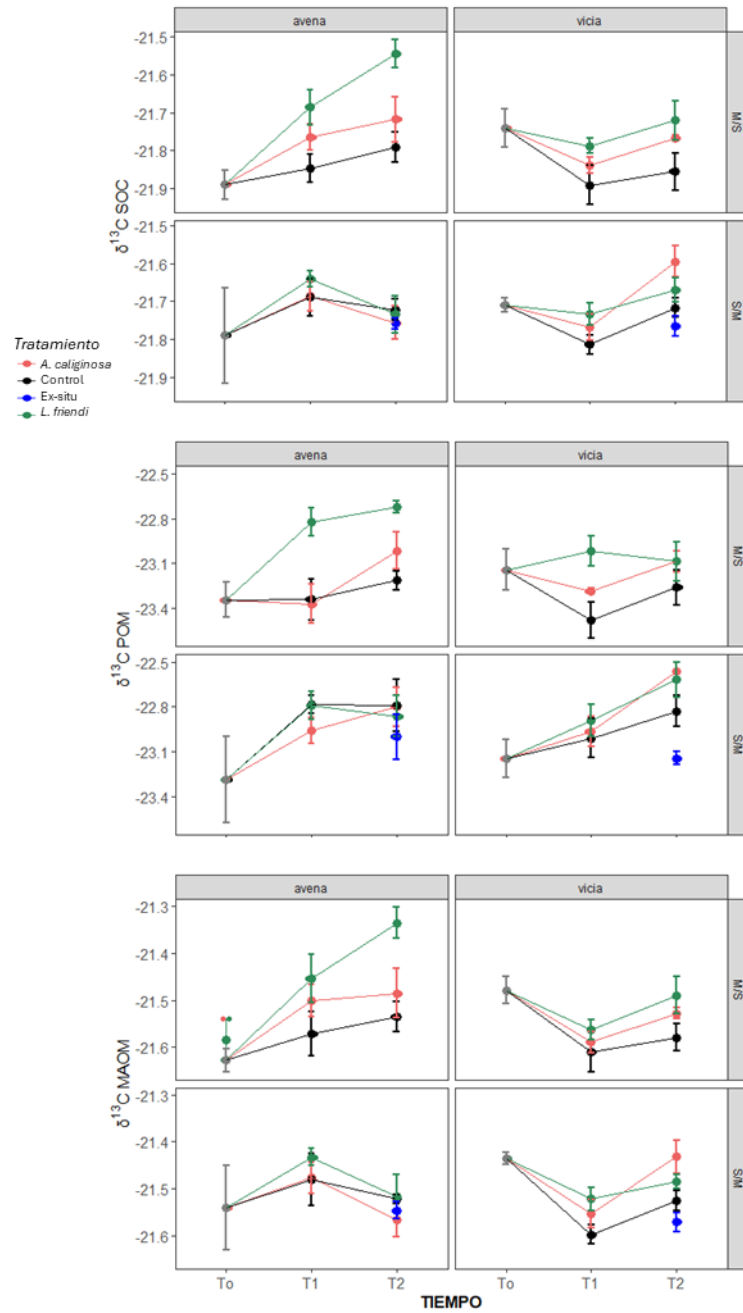


Figura A3. Señales isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$) promedio ($n=5$) para cada tiempo, fracción del suelo, tratamiento de lombriz, de planta y marcado (tejido aéreo marcado + raíz sin marcar: "M/S"; tejido aéreo sin marcar + raíz marcada: "S/M"). El experimento "ex-situ" (únicamente con *A. caliginosa*) se muestra en azul en los paneles "S/M" para facilitar la comparación con los tratamientos con raíz marcada. Las barras indican el error estándar. Diferencia con el control significativas (test de Tukey) con $p < 0.01$: **; $p < 0.05$: *; $p < 0.10$: •.

Tabla A1. Resumen de cálculos empleados para las variables utilizadas en este trabajo, su desvío estándar, y test estadístico empleado para cada comparación. Se muestran también los resultados para cada caso, señalando diferencias significativas entre los tratamientos con el control correspondiente (o todos los tratamientos vs. el T₀ en el caso de C_{original_remanente}). Diferencias significativas con p< 0.01;*: p< 0.05; •: p< 0.10.

Figura	Variable	FRACCION	CALCULO del parámetro	Calculo SD	Valores individuales?	Comparación	Test	FRACCION	A. caliginosa		L. friendi		CONTROL	
									AVENA	VICIA	AVENA	VICIA	AVENA	VICIA
-	fn	SOC	modelo de mezcla (sistema de ecuaciones)	estimación numérica	No	na	na	SOC	-	-	-	-		
		POM	modelo de mezcla (sistema de ecuaciones)	estimación numérica				POM						
Fig. 4	q	SOC	modelo de mezcla (sistema de ecuaciones)	estimación numérica	No	CONTROL vs. lombrices	Dunnett MANUAL	SOC	ns	ns	*	ns		
		POM	modelo de mezcla (sistema de ecuaciones)	estimación numérica				POM	ns	ns	**	ns		
		MAOM	modelo de mezcla (sistema de ecuaciones)	estimación numérica				MAOM	ns	ns	ns	ns		
	C_nuevo (desde aéreo o raíz)	SOC	new_SOC * q	$new_SOC_aereo_SD = \sqrt{(new_SOC_SD/stock_SOC_aereo)^2 + (q_SOC_SD/q_SOC^2)*new_SOC_aereo}$	No (se pierde SD de q)	CONTROL vs. lombrices	Dunnett MANUAL	SOC aéreo	ns	*	**	**		
		POM	new_POM * q	$new_POM_aereo_SD = \sqrt{(new_POM_SD^2 + q_POM_SD^2)*new_POM_aereo}$				SOC raíz	ns	**	ns	*		
		MAOM	new_MAOM * q	$new_MAOM_aereo_SD = \sqrt{(new_SOC_aereo_SD^2 + new_POM_aereo_SD^2)}$				POM aéreo	ns	ns	**	ns		
								POM raíz	ns	*	ns	ns		
								MAOM aéreo	ns	*	*	*		
								MAOM raíz	ns	*	ns	ns		
	C_MAOMnuevo desde POM	MAOM	$new_maom * (c13_maom_j - c13_fuente_comb_soc) + c_maom_f * (c13_maom_f - c13_maom_i) / (c13_pom_j - c13_maom_i)$	$PaM_MAOM_SD = (((b - c) ^ 2 * \delta a ^ 2 + (a + (a * (b - c) + d * (e - b)) / (f - b) - d) ^ 2 * \delta b ^ 2 + (e - b) ^ 2 * \delta d ^ 2 + d ^ 2 * \delta e ^ 2 + (-[a * (b - c) + d * (e - b)]) ^ 2 * \delta f ^ 2 / (f - b) ^ 2) / (f - b) ^ 2 + ((f - b) ^ 2 * (-2)) ^ 2 * (b - f) ^ 2 * a ^ 2 * \delta c ^ 2) ^ (1 / 2)$	No (se pierden SDs)	CONTROL vs. lombrices	Dunnett MANUAL	MAOM	ns	ns	ns	ns		
Fig. 5	C_original	SOC	stock_SOC - new_SOC	$orig_SOC_SD = \sqrt{(stock_SOC_SD^2 + new_SOC_SD^2)}$	No (se pierden SDs)	CONTROL vs. lombrices	Dunnett MANUAL	SOC	ns	ns	ns	ns		
		POM	stock_POM - new_POM	$orig_POM_SD = \sqrt{(stock_POM_SD^2 + new_POM_SD^2)}$				POM	ns	ns	ns	ns		
		MAOM	stock_MAOM - new_MAOM - PaM	$orig_MAOM_SD = \sqrt{(stock_MAOM_SD^2 + new_MAOM_SD^2 + PaM_MAOM_SD^2)}$				MAOM	ns	ns	ns	ns		
		SOC	stock_SOC - new_SOC	$orig_SOC_SD = \sqrt{(stock_SOC_SD^2 + new_SOC_SD^2)}$	No (se pierden SDs)	To vs. T2	Dunnett MANUAL	SOC	ns	ns	ns	**	ns	*
		POM	stock_POM - new_POM	$orig_POM_SD = \sqrt{(stock_POM_SD^2 + new_POM_SD^2)}$				POM	*	*	ns	**	*	*
		MAOM	stock_MAOM - new_MAOM - PaM	$orig_MAOM_SD = \sqrt{(stock_MAOM_SD^2 + new_MAOM_SD^2 + PaM_MAOM_SD^2)}$				MAOM	ns	ns	ns	*	ns	ns
Fig. A1	C_nuevo	SOC	stock_SOC * fn	$new_SOC_SD = \sqrt{(stock_SOC_SD/stock_SOC)^2 + (fn_SOC_SD/fn_SOC^2)*new_SOC}$	no (se pierde SD de fn)	CONTROL vs. lombrices	Dunnett MANUAL	SOC	ns	**	**	**		
		POM	stock_POM * fn	$new_POM_SD = \sqrt{(stock_POM_SD^2 + fn_POM_SD^2)*new_POM}$				POM	ns	*	*	*		
		MAOM	new_SOC - new_POM	$new_MAOM_SD = \sqrt{(new_SOC_SD^2 + new_POM_SD^2)}$				MAOM	ns	*	*	*		
Fig. A2	C_COS_f	SOC	stock_POM + stock_MAOM	stock_SOC_SD = sd	sí	CONTROL vs. lombrices	LMM (& Tukey)	SOC	ns	*	ns	*		
		POM	dato medido	stock_POM_SD = sd				POM	no hecho	no hecho	no hecho	no hecho		
		MAOM	dato medido	stock_MAOM_SD = sd				MAOM	no hecho	no hecho	no hecho	no hecho		
Fig. A3	δ13C	SOC	dato medido	sd	sí	CONTROL vs. lombrices	LMM (& Tukey)	SOC m/s	ns	ns	*	*		
		POM	dato medido	sd				SOC s/m	ns	ns	ns	ns		
		MAOM	dato medido	sd				POM m/s	ns	ns	**	ns		
								POM s/m	ns	ns	ns	ns		
								MAOM m/s	ns	ns	*	ns		
								MAOM s/m	ns	*	ns	ns		

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL

Aportes de esta tesis al conocimiento previo sobre las comunidades de lombrices en Uruguay y la región pampeana

Hasta 2018 en Uruguay siete estudios reportaban estimaciones de abundancia de comunidades de lombrices en pastizales naturales (o controles similares) y cultivos agrícolas y únicamente tres de estos incluían estimaciones de biomasa de lombrices (Tabla 2). Estos trabajos reportaron tendencias opuestas en la abundancia y biomasa de lombrices al comparar estos agroecosistemas y, recientemente, Alvarez et al. (2024) reportaron valores superiores de biomasa en cultivos agrícolas. Sin embargo, estos trabajos no fueron diseñados para realizar esta comparación específica entre pastizales naturales y cultivos agrícolas. Las características de las comunidades de lombrices dependen de diversos factores, como la precipitación o régimen hídrico del suelo (Phillips et al., 2021), los cuales generan una enorme variabilidad y por lo tanto dificultan la comparación de usos del suelo diferentes entre sitios lejanos. En los trabajos mencionados anteriormente (y buena parte de otros similares a nivel global), el factor de interés *uso del suelo* puede estar confundido con otros como el tipo de suelo o la precipitación debido a la distancia entre sitios de muestreo. El diseño pareado de muestreo del presente estudio permitió minimizar esta dificultad y poner a prueba el efecto del uso del suelo, mostrando una tendencia de reducción de biomasa y abundancia de lombrices en cultivos agrícolas (Ligrone et al., 2024). En otros trabajos realizados en el resto de la región pampeana (Brasil y Argentina), la tendencia general sigue esta dirección, con mayores valores de abundancia en pastizales naturales que en cultivos agrícolas, con estimaciones para pastizales de entre 140 y 297 ind/m² y de 31 a 70 ind/m² para cultivos agrícolas (Clemente et al., 2003; Domínguez et al., 2009, 2010, 2018; pero ver Falco et al., 2015; Tabla 2). En una extensa revisión para Brasil, James & Brown (2006) recopilan rangos de abundancia en cultivos al borde noreste de la pampa brasileira, con máximos promedio de 92 ind/m², pero sin datos para pastizales naturales en esta región. Los reportes de biomasa de comunidades de lombrices en la región pampeana son sorprendentemente escasos, en comparación con los de abundancia, y muestran valores⁴ de 7,8 g/m² en cultivos agrícolas y 14,4 g/m² en pastizales naturales de La Pampa, Argentina, muy similares a los observados en este trabajo (Clemente et al., 2003; Tabla 2). A modo de referencia a nivel global, Edwards & Arancon (2022) recopilan

⁴ Recalculados aquí desde peso seco, asumiendo que representa un 15% del peso fresco, según ISO 23611-1 (2018)

unos 10 trabajos que promedian 118 ind/m² en “suelos arables” y barbechos, y un único registro para pastizales naturales de 250-750 ind/m². Sin distinguir entre distintos usos del suelo, las estimaciones mundiales de abundancia de lombrices se ubican entre 5 y 150 ind/m², con una media de ca. 80 ind/m², y las de biomasa entre 1 y 150 g/m², con una mediana de 7 g/m² y valores extremos de más de 2000 g/m² (Phillips et al., 2019).

Tabla 2. Trabajos publicados en revistas arbitradas existentes para Uruguay entre 1950 y 2024 y que reportan estimaciones de biomasa o abundancia de lombrices en agroecosistemas. Se muestran únicamente los valores correspondientes a coberturas de campo natural y cultivos agrícolas (excluyendo pasturas y arroz). A modo de comparación, se incluyen algunos estudios de la región pampeana y a nivel global.

Referencia	País	Zona	Año de muestreo	Época de muestreo	Uso del suelo	Biomasa g/m2 (peso fresco)	Abundancia ind/m2
Ligrone et al. 2024 (este trabajo)	Uruguay	Salto, Soriano, Flores, Florida, San José	2020 - 2021	Primavera, verano, otoño, invierno	Campo natural	26.6	223.8
					Rotaciones agrícolas	10.5	135.8
Alvarez et al. 2024	Uruguay	Durazno, Flores, Soriano, Colonia	2021	Otoño	Pastizal pastoreado	13.2 ± 1.7	97.3 ± 10.2
					Cultivos agrícolas	23.3 ± 4.3	311.5 ± 56.9
Jorge-Escudero et al. 2024 (& Jorge-Escudero 2018 TESIS)	Uruguay	Paysandú y Montevideo	2014 - 2015	Otoño y primavera 2014 y primavera 2015	Controles (bajo disturbio)	51,1	214,4
					Cultivos agrícolas	21,2	124,3
Zerbino 2012	Uruguay	Treinta y Tres	2007	Otoño y primavera	Cultivos agrícolas	nd	206
Zerbino 2011 (FPTA)	Uruguay	Cuesta basáltica y Región Centro-sur	2007 - 2008	Primavera	Campo natural	nd	56.2
Zerbino 2010	Uruguay	Colonia - La Estanzuela	2004 - 2005	Primavera 2004 y otoño 2005	Cultivos agrícolas	nd	44
Zerbino 2007 (& Zerbino 2005 TESIS)	Uruguay	Tacuarembó y Treinta y Tres	2003	Otoño (abril y setiembre)	Campo natural	9.2*	88.5
					Cultivos agrícolas	19.4*	142.8
Grosso et al. 2006	Uruguay	Canelones	1995 a 2001	nd	Campo natural	nd	290***
Zerbino y Morón 2003	Uruguay	Colonia - La Estanzuela	2003	Invierno	Cultivos agrícolas	4,1*	90
Falco et al 2015	Argentina	Pampa	2008 a 2011	1 muestreo por estación por 2 años	Pastizal naturalizado	nd	46 ± 19
					Agricultura reciente	nd	40 ± 55
					Agricultura intensiva	nd	76 ± 56
					Pastizal natural	nd	80
Dominguez y Bedano 2016	Argentina	Córdoba	2010 - 2011	Otoño	Agricultura orgánica	nd	14
					Agricultura convencional (y tillage)	nd	3
					Agricultura convencional (no-tillage)	nd	4
					Natural (pastura 20 años)	14.4	139
Clemente et al 2003	Argentina	Balcarce	1998 - 1999	Primavera 1998 y verano, otoño e invierno 1999	Ganadero orgánico	15.6	143
					Ganadero fertilizado	64.4	374
					Agrícola convencional	7.8	56
					Pastizal natural	nd	297
Dominguez et al. 2009	Argentina	Pampa - Córdoba Gral Daheza	2007	Invierno	Agricultura (siembra directa)	nd	70
Dominguez y Bedano 2010	Argentina	Pampa - Córdoba Gral Daheza	2007	Invierno y primavera**	Pastizal natural	nd	235
					Agricultura (no-till)	nd	31
Sabatté et al 2021	Argentina	Pampa	2004 - 2005	Invierno y primavera 2004 y verano y otoño 2005	Pastizal	nd	408
					Plantación eucaliptus	nd	55
Dominguez et al. 2018	Argentina	Pampa	???	???	Pastizal natural	nd	197
					Agricultura no-tillage	nd	62
					Agricultura orgánica	nd	29
					Agricultura con tillage	nd	62
James y Brown 2006 (libro Moreira et al 2006)	Brasil	Pampa (pero muy carcano a Mata Atlántica)	Varios	Varios	Cultivo anual	nd	8-20
					Cultivo cobertura, tillage	nd	0-35
					Cultivo anual, no-tillage	nd	28 - 299
					Cultivo anual, tillage	nd	0-13
Edwards y Arancon 2021 (p. 122)	Varios	Varios	Varios	Varios	Varios agrícolas	33	118
					Natural grassland	nd	500
Phillips et al. 2019	Global	Global					

* Recalculados desde peso seco, asumiendo que representa un 15% del peso fresco, según ISO 23611-1 (2018)
 ** Pero consideramos solo los datos de primavera porque los otros son los mismos que Dominguez et al. 2009, también considerado en esta tabla.
 *** Valor extraído de gráfico.
 nd = datos no disponibles

El conocimiento de la composición y taxonómica de lombrices y su distribución geográfica en Uruguay crece en cada esfuerzo de muestreo. Hasta ahora, el campo natural fue muestreado en varias ocasiones por Zerbino (Tabla 2), pero estos trabajos utilizan una descripción a nivel de familia y no de especie. Grosso et al. (2006) reportan un listado de especies para un sitio de campo natural en Canelones y Jorge-Escudero et al. (2024) un listado para un sitio de campo natural en el departamento de Paysandú. El presente trabajo agregó 7 sitios de campo natural, distribuidos por otros 5 departamentos (Fig. 7), ampliando el listado de especies reportado hasta el momento para Uruguay, en paralelo a los 3 sitios de campo natural reportados en Alvarez et al. (2024). En particular, estos muestreos permitieron colecta de ejemplares de la familia Glossoscolecidae en Soriano y San José, ampliando su límite de distribución sur en el país, anteriormente 80 km al norte en la Unidad Experimental de Palo a Pique del INIA, en Treinta y Tres (Zerbino, 2007). Sabemos muy poco sobre esta familia en Uruguay, e.g. sobre su densidad en diferentes tipos de suelo y la distribución geográfica de especies. Como ejemplo de esta brecha de conocimiento, cabe mencionar que en el marco de este trabajo, un maestro de una escuela de Salto envió a nuestro equipo ejemplares encontrados con sus alumnos en su huerta escolar en Salto, que identificamos como una nueva especie para Uruguay, *Glossoscolex pampas* (sin publicar), en colaboración con investigadores de las universidades de Coímbra (Portugal) y Paraná (Brasil), Dra. Marie Bartz y Dr. George Brown. En Uruguay, el género nativo *Glossoscolex* cuenta con 4 especies reportadas (Grosso & Brown, 2007) a las que se adiciona *G. pampas*, aún sin publicar. Representa un grupo funcional de especies endógeas geófagas, con *G. colonorum* y *G. pampas* alcanzando los 50 cm de largo (Cordero, 1931); observación personal), que dependiendo de la densidad de sus poblaciones tienen un importante potencial de alterar el funcionamiento y estructura del suelo en sistemas naturales y productivos. Sin embargo, son escasamente colectadas en los muestreos tradicionales dada la profundidad de su distribución vertical en el suelo, bastante mayor a los 20 cm muestreados usualmente, por lo que nuevos esfuerzos de muestreo deberían considerar técnicas que accedan a profundidades mayores. A su vez, estos muestreos y la colaboración del Dr. Sam James (Universidad de Iowa, EEUU) permitieron la identificación de ejemplares de *Kerriana sp.*, un nuevo género nativo para Uruguay que se suma a *Eukerria* en la familia Ocnerodrilidae.

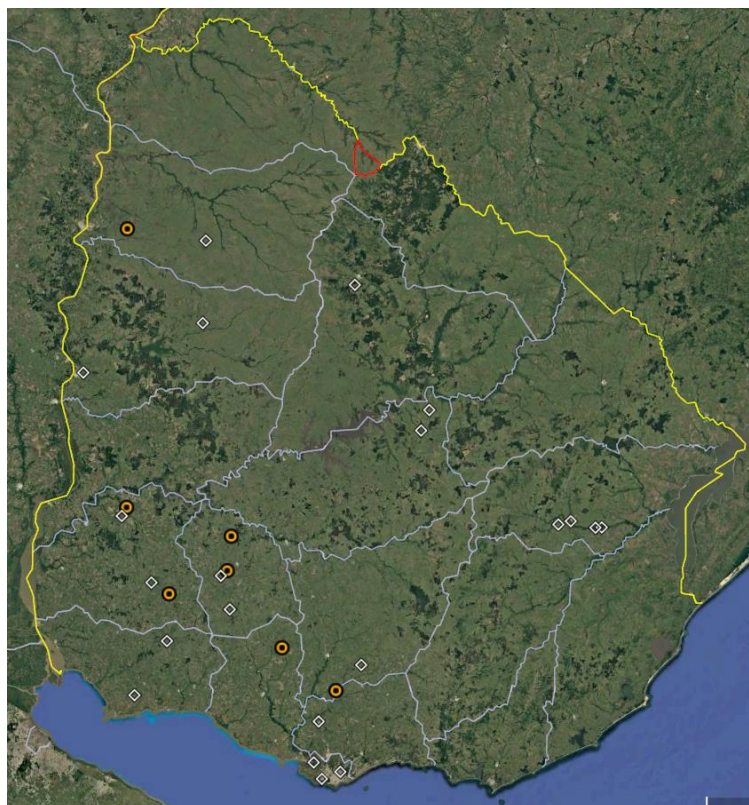


Figura 7. Sitios muestreados en Uruguay hasta el presente (rombos blancos), incluyendo los relevados en este trabajo (círculos anaranjados).

Los Pastizales del Río de la Plata, o bioma Pampa, representan una extensión de pastizales de ca. 750.000 km² de relevancia global (Soriano, 1992), de la cual el 23% se encuentra en Uruguay. Este trabajo amplió el conocimiento sobre la biodiversidad de la fauna edáfica de esta región, en términos taxonómicos y funcionales, lo que se espera aporte a su conservación y uso más sustentable. El conocimiento acumulado para Uruguay hasta hoy, incluyendo los aportes recientes mencionados arriba, se alinea con sugerencias anteriores de que rotaciones agrícolas muy intensivas, con baja proporción de pasturas (como las analizadas en este trabajo), pueden disminuir el número de lombrices y su diversidad funcional, por lo que se recomienda evitar ese tipo de manejos, aumentando los períodos de pasturas en la rotaciones (Bedano et al., 2016).

Finalmente, los muestreos desarrollados para el Objetivo 1 de este trabajo (Capítulo 2) presentaron la dificultad de la ocurrencia de primaveras particularmente secas. Esto dificultó la logística del muestreo (generó mayor distancia en tiempo entre muestreos por necesidad) y la detectabilidad de los individuos (muchos juveniles en diapausa y presuntamente buena parte

de los adultos a profundidades mayores a los 20 cm muestreados). Sin embargo, esta condición permitió contar con un rango más amplio y completo de valores de humedad del suelo asociados a los atributos de comunidad, lo que representa una oportunidad para evaluar el efecto de la humedad a mayor detalle en futuros esfuerzos (utilizando también la información relevada en Alvarez et al. (2024) y Jorge-Escudero et al. (2024).

A su vez, nuevos análisis de estos datos respecto al vínculo entre los atributos de comunidad y los parámetros ambientales pueden fortalecerse mediante:

- i) incorporación de las variables productividad primaria neta aérea y lluvia acumulada (e.g. en diferentes ventanas temporales), aportando variables ambientales que se espera que incidan en la comunidad en escalas temporales mayores a las utilizadas;
- ii) la jerarquización de estas variables en el/los modelos. Esto último implica evaluar si corresponde aplicar un único modelo con todas las variables o tomar una aproximación de modelos jerárquicos (sensu Kéry & Royle (2015), modelando por separado los efectos de la detectabilidad en el muestreo y de los mecanismos ecológicos de interés.
- iii) aproximaciones basadas en ecuaciones estructurales (e.g. PATH análisis), especialmente útiles en casos como este en los que se espera que existan feedbacks entre las variables ambientales y de respuesta (i.e. atributos de comunidad). Por ejemplo, es esperable que el contenido de materia orgánica favorezca la presencia de lombrices, pero que éstas a su vez afecten su dinámica. El diseño de este muestreo no permite diferenciar estas relaciones potencialmente importantes, que idealmente serán consideradas en futuros esfuerzos de investigación.
- iv) la consideración de efectos del manejo agrícola no representados en las variables utilizadas, como el uso de agroquímicos, la disponibilidad de fuentes de alimento (e.g. fenología, cantidad y calidad de rastrojo, raíces y rizodeposición) y la temperatura del suelo.

Aporte de esta tesis a comprender el impacto de las lombrices sobre la dinámica del C en los ecosistemas

Las diferencias observadas entre las comunidades de lombrices presentes en el campo natural y en suelos agrícolas redundan en el efecto que éstas tienen sobre el agroecosistema. Dadas las diferencias observadas en composición de especies, se espera que las comunidades en el pastizal natural presenten mayor rango de uso de recursos dada la mayor diversidad de grupos ecológicos (i.e. mayor rango de distribución vertical de la comunidad, hábitos alimenticios y

calidad de fuentes de alimentación utilizadas) y el rango mayor de tamaños (también acceso a diferentes fuentes de alimento). Considerando las diferencias observadas en densidad, biomasa y peso individual se espera una disminución del efecto bioingeniero de estas comunidades (i.e. efecto sobre funcionamiento ecosistémico) debido a i) menor cantidad de suelo ingerido (por menor biomasa total, a lo que se agrega condiciones de humedad menos favorables para la alimentación durante época activa del año, y entonces probablemente menor proporción del año alimentándose) y ii) menos galerías (por menor densidad) y más chicas (por menor tamaño corporal). A su vez, individuos más grandes podrían basar sus estrategias de estivación en movimientos verticales en mayor medida que los pequeños (Edwards & Arancon, 2022), con lo que se espera una dinámica estacional de movimiento vertical de la biomasa total mucho más marcado en el pastizal natural.

Se espera una relación estrecha y positiva entre la biomasa de la comunidad de lombrices y su capacidad directa e indirecta de incidir en la estructura (e.g. densidad de galerías, descompactación/compactación) y funcionamiento (e.g. secuestro y mineralización de carbono, descomposición de materia orgánica) del suelo (W. Huang et al., 2020). Gran parte de la incidencia de las lombrices sobre el ecosistema está vinculada a la ingesta de suelo o residuos orgánicos, que depende del tamaño corporal (Curry & Schmidt, 2007) y entonces a nivel comunitario de la biomasa total y probablemente también de la distribución de tamaños corporales (puesto que se esperan relaciones alométricas con la alimentación). Por ejemplo, según nuestras estimaciones anuales de biomasa para el campo natural de 19 g/m^2 y de 7 g/m^2 para la agricultura, y asumiendo una tasa de consumo de suelo intermedia de 1.8 g de suelo seco/g de lombriz viva por día (en base a Curry & Schmidt (2007)) y una densidad aparente de suelo de 1.1 g/cm^3 , es razonable esperar un consumo anual del 16% del suelo correspondiente a los primeros 20 cm en el campo natural, pero de 6% para el suelo bajo agricultura (o de 5% calculando con la densidad aparente media en el cultivo agrícola, i.e. 1.2 g/cm^3). Estas estimaciones son cercanas a las obtenidas por James (1991) en pastizales de EEUU y coherentes con las estimaciones de producción de casts recopiladas por Edwards & Arancon (2022) y permiten dimensionar el efecto negativo del uso agrícola del suelo sobre la capacidad de incidencia de las comunidades de lombrices sobre el ecosistema, desde su rol como bioingenieros. Sin embargo, deberían ser ajustadas debido a que la tasa de consumo varía con la temperatura y humedad del suelo y es mayor a menor contenido de materia orgánica, a menor tamaño corporal y en etapas de desarrollo juveniles, entre otros factores (Curry & Schmidt, 2007). Más allá de esto, estos cálculos muestran como en ecosistemas agrícolas, que muchas veces se producen acumulaciones importantes de rastros, éstos podrían ser

descompuestos más rápidamente, e incorporados al suelo por las lombrices especialmente aquellas que se alimentan de residuos en superficie.

En concordancia, los resultados del Capítulo 3 sugieren que una comunidad de lombrices predominantemente anécica (y saprófaga) tiene mayor potencial de aportar al mantenimiento del C del suelo incorporando C nuevo mayormente desde rastrojos en superficie si el cultivo es de alto C:N, o también desde raíz si el C:N es bajo. A su vez, sugieren que comunidades predominantemente endógeas (y geófagas) tienen mayor potencial de aportar al mantenimiento del C del suelo mediante incorporación de C nuevo y evitar la pérdida del C existente, de mayor antigüedad (principalmente en la MAOM), dependiendo de la cantidad y calidad de la rizodeposición. En este sentido, las lombrices estarían aumentando la “eficiencia de formación del COS” de residuos al suelo. En base a los resultados obtenidos en el capítulo 3 se estimó la eficiencia de formación de COS, mostrando un aumento importante para ambas lombrices y para residuos aéreos o subterráneos y a ambas fracciones de la materia orgánica (POM y MAOM) (Fig. 8).

En Uruguay, las comunidades de lombrices muestran ser predominantemente geófagas, aunque con representación de especies epi-endógeas en suelos bajo cultivos agrícolas algo mayor al campo natural (Ligrone et al., 2024). Los reportes de las anécicas *Lumbricus terrestris* y *L. friendi* están limitados a cultivos de frutales u horticultura y asociados a transporte de inóculos en materia orgánica utilizada como insumo agrícola (Grosso et al., 2006; Jorge-Escudero et al., 2024). En este sentido, se espera que en agroecosistemas de Uruguay el mayor potencial de efecto de las comunidades de lombrices sobre la incorporación y mantenimiento del COS esté asociado a comunidades vegetales con alta producción de rizodeposición y baja relación C:N, y en épocas de mayor actividad de lombrices, que muestran ser otoño e invierno, y primavera si no se presentan períodos prolongados de sequía. Es posible que en estos casos sea particularmente relevante, para favorecer la productividad y salud del suelo, monitorear la comunidad de lombrices y utilizar prácticas de manejo que promuevan su abundancia y diversidad funcional, e.g. reducir laboreo y uso de pesticidas, aumentar la proporción de pasturas y diversidad en las rotaciones y la disponibilidad de rastrojo u otras entradas de materia orgánica al suelo (Bedano et al., 2016, 2019; Bertrand et al., 2015; Edwards & Arancon, 2022).

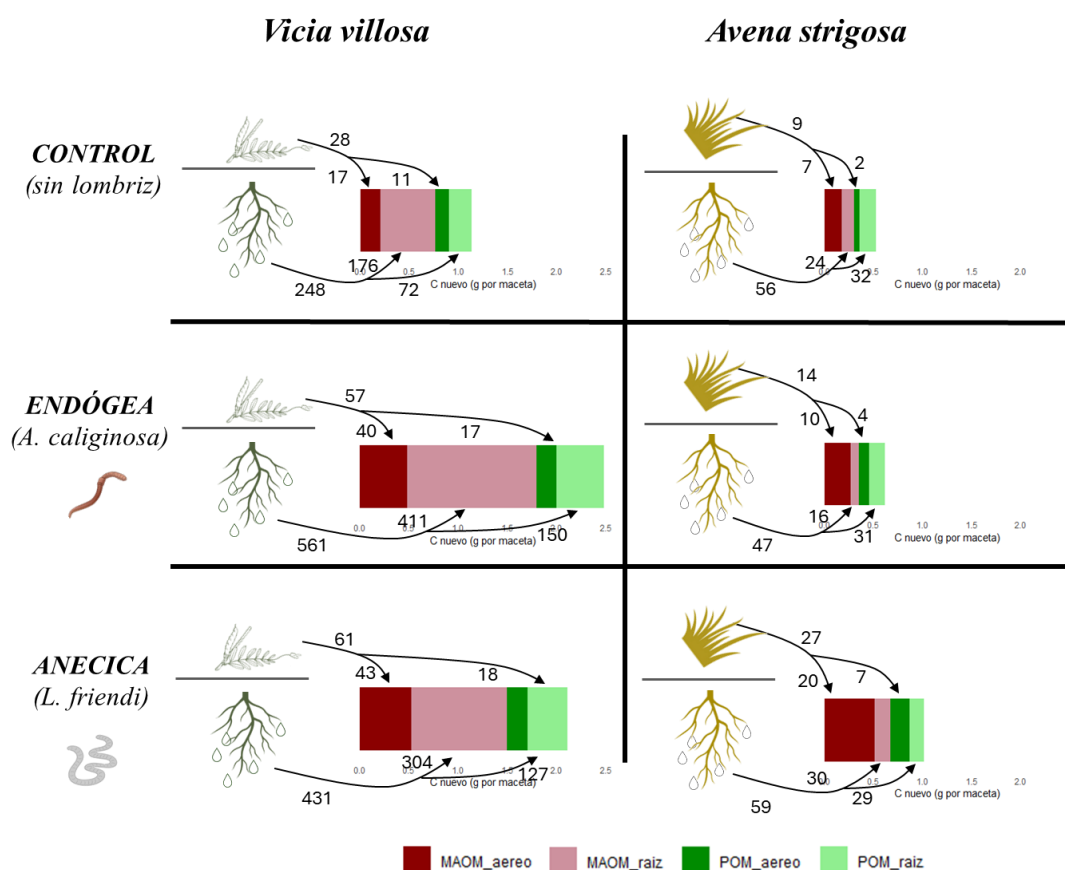


Figura 8. Eficiencia de formación del COS al tiempo final (T_2 , 40 días) para cada tratamiento. Los números representan el porcentaje del C total presente en la biomasa vegetal aérea o raíz (sin contar la rizodeposición) al inicio de la incubación (T_0) que fue incorporado a cada fracción del suelo (i.e. POM o MAOM). Los valores relativos a las raíces están sobreestimados porque no consideran el C de la rizodeposición, que en vicia puede ser más de 10 veces mayor que el presente en el tejido vivo de raíz. En base a Berenstecher et al. (en preparación).

La relevancia de las características de la comunidad microbiana sobre la dinámica del COS es cada vez más comprendida (Cotrufo & Lavelle, 2022; Sokol et al., 2024) y, paralelamente, también lo es la influencia de las lombrices sobre las comunidades de microorganismos (Medina-Sauza et al., 2019; Scheu, 1987). El acercamiento de estas dos líneas de investigación resulta un esfuerzo particularmente prometedor para la comprensión de los efectos de la biota edáfica sobre el funcionamiento del suelo (Angst et al., 2019, 2021). En este sentido, el presente estudio incluyó la caracterización de la comunidad de microorganismos en los microcosmos, en colaboración con investigadores del Instituto Pasteur de Montevideo y del Grupo Disciplinario de Microbiología y Biotecnología del Departamento de Biología de la Facultad de Agronomía. Estas observaciones preliminares (no mostradas en este trabajo), no muestran diferencias significativas entre los tratamientos de lombrices en términos de

diversidad taxonómica y funcional (mediante técnicas de metagenómica) y actividad enzimática de deshidrogenasa, fosfatasa y ureasa (por colorimetría), sugiriendo que en este caso los efectos observados se deben a otros factores. A su vez, Giménez et al. (sin publicar) analizaron las comunidades microbianas de algunos de los sitios muestreados en este trabajo, encontrando efectos del uso agrícola del suelo en la dirección de disminución de la diversidad de hongos y reconfiguración de la estructura de la comunidad microbiana. La vía de entrada del C al suelo depende del tipo de comunidad microbiana (e.g. dominada por hongos o bacterias), resulta clave explorar la interacción entre la actividad de las lombrices, según sus hábitos alimenticios, y las características de la comunidad bacteriana. Por ejemplo, el efecto sobre el balance del COS dado por la actividad de una especie geófaga como *A. caliginosa* (que observamos promueve la conservación de C original del suelo y la protección del C nuevo desde la rizodeposición) puede tender a mayor secuestro de C en comunidades con baja biomasa de bacterias y dominancia de hongos, en las que la llegada de C a la MAOM depende más de la *direct sorption* (Sokol, Sanderman, et al., 2019), debido a que el C tiene menor probabilidad de ser catabolizado por bacterias antes de ser protegido en agregados. Comprender este tipo de interacciones es clave para lograr manejos agronómicos más sustentables y utilizando soluciones basadas en naturaleza (UICN, 2020).

Un factor no considerado en el diseño y análisis del Capítulo 3 fue la posibilidad de sesgos en la medición de las señales isotópicas de referencia. Por ejemplo, J. Huang et al. (2015) reportan que las porciones de raíz más finas están más enriquecidas en ^{13}C que las más gruesas, mientras que Fahey et al. 2012 (en Gilbert et al. (2014)) reportan lo contrario. Este sesgo podría generar sub o sobreestimaciones del C nuevo debido a la forma de extracción de las muestras. Al momento de extraer las raíces del suelo para su procesamiento y cuantificación de ^{13}C es posible que los fragmentos de raíz más finos queden en el suelo y se pierdan en mayor proporción que los gruesos, por su mayor fragilidad y menor tamaño. En este sentido, las señales de biomasa vegetal de referencia estarían siendo subestimadas. Por otro lado, la interacción de las lombrices con las raíces probablemente dependa del tamaño de los fragmentos, esperando mayor ingesta de fragmentos finos (Boström & Astrid Lofs, 1986), sesgando la llegada de C nuevo con mayor enriquecimiento, y entonces sobreestimando estos valores. Esta dificultad podría superarse caracterizando la señal de ^{13}C para distintas fracciones del tejido de raíz, estimando su proporción en la biomasa total y aplicando un análisis de sensibilidad asumiendo diferentes escenarios de interacción con las lombrices.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Para seguir avanzando eficientemente en el estudio de las comunidades de lombrices y su vínculo con el entorno, parece difícil evaluar el efecto de las lombrices sobre el funcionamiento del suelo especie por especie y en diversas condiciones ambientales. En este sentido, es clave la aproximación desde la ecología funcional, poniendo el foco en rasgos funcionales y no en las especies individuales (Pey et al., 2014).

La revisión realizada para Uruguay y la región Pampeana mostró que los reportes de biomasa de lombrices en la literatura científica son notoriamente menos frecuentes que los de abundancia. Se subraya la necesidad de reportar esta variable en futuras publicaciones, dada la relevancia de esta variable para el estudio de comunidades. A su vez, este trabajo mostró la utilidad de utilizar el atributo de tamaño individual al describir las comunidades de lombrices, en virtud de su relevancia como determinante del efecto sobre la estructura y funcionamiento del ecosistema (e.g. como rasgo de respuesta a eventos de sequía o de efecto sobre las características de la drilósfera o eficiencia en el uso energético). En vistas de la escasez de trabajos que lo incluyan se sugiere considerar su incorporación en futuros esfuerzos.

Finalmente, algunas consideraciones para fortalecer a futuro el diseño de experimentos similares al realizado en esta tesis son i) incluir tratamientos control sin planta ni lombriz (lo que habilitaría la estimación del priming en los microcosmos) y aumentar el número de réplicas de los controles (para aumentar la potencia estadística de las pruebas de hipótesis, dada la disponibilidad de modelos que consideran el desbalance de datos); ii) utilizar especies nativas como *M. dubius* o *Glossoscolex spp.* (el uso de *M. dubius* fue intentado sin éxito, dada su alta mortalidad en cautiverio) para fortalecer el conocimiento sobre las comunidades locales de lombrices; y iii) considerar la rizodeposición de las plantas en el diseño experimental, con el fin de identificar su relevancia relativa en el efecto de las lombrices sobre el funcionamiento del suelo.

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo permitió, en base a relevamientos de campo, identificar una reducción notable de la biomasa, la densidad y el peso corporal promedio de las lombrices de tierra en suelos bajo cultivos agrícolas, respecto al pastizal natural pastoreado. Asimismo, la riqueza, diversidad, equitatividad y composición de rasgos funcionales también se vieron afectados. Estos efectos se atribuyeron a filtros que limitan la abundancia de especies exóticas en los cultivos, siendo el régimen hídrico del suelo y el contenido de materia orgánica los factores que posiblemente medien estos efectos. A su vez, la mirada temporal mostró que los efectos de los cultivos se expresan en mayor medida durante el invierno y el otoño. Estos resultados sugieren la existencia de un importante déficit de biomasa y diversidad funcional de lombrices en algunos agroecosistemas, en particular de especies endógeas de mayor tamaño, probablemente limitando su capacidad de aportar a la provisión de servicios ecosistémicos y a la sustentabilidad de la producción agrícola. Por otro lado, el experimento desarrollado proporcionó una descripción y cuantificación detallada de cómo los hábitos alimenticios de las lombrices de tierra afectan la dinámica del carbono en el suelo. Dos mecanismos fueron identificados: la incorporación de carbono nuevo, observada en ambas especies de lombrices, y el mantenimiento de carbono original y nuevo, principalmente asociado a especies geófagas. A su vez, los mecanismos varían en función de la calidad del residuo vegetal y su ubicación (aéreo o subterráneo) y, en particular, los resultados sugieren que los efectos de la lombriz endógea depende más de la rizodeposición que del tejido macroscópico de la raíz. Así, la relación C de raíz: C de rizodeposición de la vegetación (e.g. de las especies de interés agronómico) se visualiza como un factor clave para comprender la influencia de las lombrices en la dinámica del carbono orgánico en el suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aerts, R. (1997). Climate, Leaf Litter Chemistry and Leaf Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems: A Triangular Relationship. *Oikos*, 79(3), 439–449. <https://doi.org/10.2307/3546886>
- Ahmed, N., & Al-Mutairi, K. A. (2022). Earthworms Effect on Microbial Population and Soil Fertility as Well as Their Interaction with Agriculture Practices. *Sustainability*, 14(13), 7803. <https://doi.org/10.3390/su14137803>
- Alegre, J. C., Pashanasi, B., & Lavelle, P. (1996). Dynamics of Soil Physical Properties in Amazonian Agroecosystems Inoculated with Earthworms. *Soil Science Society of America Journal*, 60(5), 1522–1529. <https://doi.org/10.2136/sssaj1996.03615995006000050033x>
- Al-Maliki, S., & Scullion, J. (2013). Interactions between earthworms and residues of differing quality affecting aggregate stability and microbial dynamics. *Applied Soil Ecology*, 64, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.008>
- Alvarez, M., Ligrone, A., Piñeiro, G., & Jorge-Escudero, G. (2024). Effects of cropping sequences and rotational grazing on diversity, biomass, density and body mass of earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 122, 103647. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2024.103647>
- Alvarez, R., Steinbach, H. S., & De Paepe, J. L. (2017). Cover crop effects on soils and subsequent crops in the pampas: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research*, 170, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.still.2017.03.005>
- Angst, G., Angst, Š., Frouz, J., Peterse, F., & Nierop, K. G. J. (2020). Preferential degradation of leaf- vs. Root-derived organic carbon in earthworm-affected soil. *Geoderma*, 372, 114391. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114391>
- Angst, G., Mueller, C. W., Prater, I., Angst, Š., Frouz, J., Jílková, V., Peterse, F., & Nierop, K. G. J. (2019). Earthworms act as biochemical reactors to convert labile plant compounds into stabilized soil microbial necromass. *Communications Biology*, 2(1), 441. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0684-z>
- Angst, G., Mueller, K. E., Nierop, K. G. J., & Simpson, M. J. (2021). Plant- or microbial-derived? A review on the molecular composition of stabilized soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 156, 108189. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108189>
- Angst, G., Potapov, A., Joly, F.-X., Angst, Š., Frouz, J., Ganault, P., & Eisenhauer, N. (2024). Conceptualizing soil fauna effects on labile and stabilized soil organic matter. *Nature Communications*, 15(1), 5005. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49240-x>
- Balesdent, J., Mariotti, A., & Guillet, B. (1987). Natural ¹³C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90120-9)
- Barthod, J., Dignac, M.-F., Le Mer, G., Bottinelli, N., Watteau, F., Kögel-Knabner, I., & Rumpel, C. (2020). How do earthworms affect organic matter decomposition in the presence of clay-sized

minerals? *Soil Biology and Biochemistry*, 143, 107730.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107730>

Bayley, M., Overgaard, J., Høj, A. S., Malmendal, A., Nielsen, N. C., Holmstrup, M., & Wang, T. (2010). Metabolic Changes during Estivation in the Common Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(3), 541–550.

<https://doi.org/10.1086/651459>

Bedano, J. C., Domínguez, A., Arolfo, R., & Wall, L. G. (2016). Effect of Good Agricultural Practices under no-till on litter and soil invertebrates in areas with different soil types. *Soil and Tillage Research*, 158, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.still.2015.12.005>

Bedano, J. C., Vaquero, F., Domínguez, A., Rodríguez, M. P., Wall, L., & Lavelle, P. (2019). Earthworms contribute to ecosystem process in no-till systems with high crop rotation intensity in Argentina. *Acta Oecologica*, 98, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.05.003>

Berenstecher, P., Conti, G., Faigón, A., & Piñeiro, G. (2023). Tracing service crops' net carbon and nitrogen rhizodeposition into soil organic matter fractions using dual isotopic brush-labeling. *Soil Biology and Biochemistry*, 184, 109096.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2023.109096>

Bertrand, M., Barot, S., Blouin, M., Whalen, J., de Oliveira, T., & Roger-Estrade, J. (2015). Earthworm services for cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 553–567. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0269-7>

Binet, F., Fayolle, L., Pussard, M., Crawford, J. J., Traina, S. J., & Tuovinen, O. H. (1998). Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 27(1), 79–84. <https://doi.org/10.1007/s003740050403>

Blanchart, E., Albrecht, A., Alegre, J., Duboisset, A., Villenave, C., Pashanasi, B., Lavelle, P., & Brussaard, L. (1999). Effects of earthworms on soil structure and physical processes. In *Earthworm management in tropical agroecosystems* (pp. 149–172). <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/60580>

Blanchart, E., Lavelle, P., & Spain, A. V. (1990). Effects of biomass and size of *Millsonia anomala* (Oligochaeta: Acanthodrilidae) on particle aggregation in a tropical soil in the presence of *Panicum maximum* (Gramineae). *Biology and Fertility of Soils*, 10(2), 113–120. <https://doi.org/10.1007/BF00336246>

Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J. E., Cluzeau, D., & Brun, J.-J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services: Earthworm impact on ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161–182. <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>

Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2004). Rapid incorporation of carbon from fresh residues into newly formed stable microaggregates within earthworm casts: Incorporation of carbon in worm casts. *European Journal of Soil Science*, 55(2), 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.1351-0754.2004.00603.x>

- Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2005). Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.035>
- Bossuyt, H., Six, J., & Hendrix, P. F. (2006). Interactive effects of functionally different earthworm species on aggregation and incorporation and decomposition of newly added residue carbon. *Geoderma*, 130(1–2), 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.01.005>
- Boström, U., & Astrid Lofs, I. (1986). Growth of earthworms (*Allolobophora caliginosa*) fed shoots and roots of barley, meadow fescue and lucerne Studies in relation to particle size, protein, crude fiber content and toxicity. *Pedobiologia*, 29(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0031-4056\(23\)06875-0](https://doi.org/10.1016/S0031-4056(23)06875-0)
- Bottinelli, N., Hedde, M., Jouquet, P., & Capowiez, Y. (2020). An explicit definition of earthworm ecological categories – Marcel Bouché’s triangle revisited. *Geoderma*, 372, 114361. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114361>
- Bouché, M. B. (1977). Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins*, 122-132.
- Boyer, J., Reversat, G., Lavelle, P., & Chabanne, A. (2013). Interactions between earthworms and plant-parasitic nematodes. *European Journal of Soil Biology*, 59, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.10.004>
- Brown, G. G., & Doube, B. M. (2004). Functional Interactions between Earthworms, Microorganisms, Organic Matter, and Plants. In *Earthworm Ecology* (2nd ed.). CRC Press.
- Buck, C., Langmaack, M., & Schrader, S. (1999). Nutrient content of earthworm casts influenced by different mulch types. *European Journal of Soil Biology*, 35(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(99\)00102-8](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(99)00102-8)
- Butt, K. R., & Briones, M. J. I. (2011). Life cycle studies of the earthworm *Lumbricus friendi* (Cognetti, 1904). *Pedobiologia*, 54, S27–S29. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.08.003>
- Cambardella, C. A., & Elliott, E. T. (1992). Particulate Soil Organic-Matter Changes across a Grassland Cultivation Sequence. *Soil Science Society of America Journal*, 56(3), 777–783. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600030017x>
- Capowiez, Y., Bonzom, J.-M., Bottinelli, N., & Gilbert, F. (2024). The burrowing and casting dynamics of earthworms are influenced by litter presence as evidenced by repeated scans and a new marker of bioturbation. *Applied Soil Ecology*, 202, 105569. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2024.105569>
- Cheng, X., Xing, W., & Liu, J. (2023). Litter chemical traits, microbial and soil stoichiometry regulate organic carbon accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Biology and Fertility of Soils*, 59(7), 777–790. <https://doi.org/10.1007/s00374-023-01746-0>
- Clemente, N., López, A., Vincini, A., Castillo, H. A., Carmona, D., Manetti, P., & Martino, S. S. (2003). Abundancia de megadrilos (annelida: Oligochaeta) en diferentes sistemas de producción. *Ciencia del Suelo*, 9.

- Coq, S., Barthès, B. G., Oliver, R., Rabary, B., & Blanchart, E. (2007). Earthworm activity affects soil aggregation and organic matter dynamics according to the quality and localization of crop residues—An experimental study (Madagascar). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 2119–2128. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.03.019>
- Cordero, E. (1930). Die oligochaeten der Republik Uruguay I. *Zoologischer Anzeiger*.
- Cordero, E. (1931). Notas sobre los oligoquetos del Uruguay. *Anales Del Museo Nacional de Historia Natural Bernardino Rivadavia, Buenos Aires*, 343–357.
- Cordero, E. (1942). Oligoquitos terrícolas del museo argentino de ciencias naturales. *Anales Del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 269–298.
- Cordero, E. (1943a). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae I. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(2).
- Cordero, E. (1943b). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae II. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(6).
- Cordero, E. (1944a). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae III. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(10).
- Cordero, E. (1944b). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae IV. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(14).
- Cordero, E. (1944c). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae V. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(18).
- Cordero, E. (1945). Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae VI. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1(22).
- Cortez, J., & Bouche, M. (1992). Do earthworms eat living roots. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Cotrufo, M. F., & Lavelle, J. M. (2022). Soil organic matter formation, persistence, and functioning: A synthesis of current understanding to inform its conservation and regeneration. In *Advances in Agronomy* (Vol. 172, pp. 1–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2021.11.002>
- Cotrufo, M. F., Soong, J. L., Horton, A. J., Campbell, E. E., Haddix, M. L., Wall, D. H., & Parton, W. J. (2015). Formation of soil organic matter via biochemical and physical pathways of litter mass loss. *Nature Geoscience*, 8(10), 776–779. <https://doi.org/10.1038/ngeo2520>
- Csuzdi, C., & Szilávecz, K. (2003). LUMBRICUS FRIENDI COGNETTI, 1904 A NEW EXOTIC EARTHWORM IN NORTH AMERICA. *Northeastern Naturalist*, 10(1).
- Curry, J. P. (2004). Factors affecting the abundance of earthworms in soils. In C. A. Edwards (Ed.), *Earthworm ecology* (2nd ed). International Symposium on Earthworm Ecology, Boca Raton, Fla. CRC Press.

- Curry, J. P., & Schmidt, O. (2007). The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia*, 50(6), 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.09.001>
- Domínguez, A., Bedano, J. C., & Becker, A. R. (2009). Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina. *Ciencia Del Suelo*, 27(1), 11–19.
- Domínguez, A., Bedano, J. C., & Becker, A. R. (2010). Negative effects of no-till on soil macrofauna and litter decomposition in Argentina as compared with natural grasslands. *Soil and Tillage Research*, 110(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.06.008>
- Domínguez, A., Jiménez, J. J., Ortiz, C. E., & Bedano, J. C. (2018). Soil macrofauna diversity as a key element for building sustainable agriculture in Argentine Pampas. *Acta Oecologica*, 92, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2018.08.012>
- Dunnett, C. W. (1955). *A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control*.
- Eck, T., Potthoff, M., Dyckmans, J., Wichern, F., & Joergensen, R. G. (2015). Priming effects of *Aporrectodea caliginosa* on young rhizodeposits and old soil organic matter following wheat straw addition. *European Journal of Soil Biology*, 70, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.07.002>
- Edwards, C. A., & Arancon, N. Q. (2022). *Biology and Ecology of Earthworms*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74943-3>
- Euteneuer, P., Wagentristsl, H., Steinkellner, S., Fuchs, M., Zaller, J. G., Piepho, H.-P., & Butt, K. R. (2020). Contrasting effects of cover crops on earthworms: Results from field monitoring and laboratory experiments on growth, reproduction and food choice. *European Journal of Soil Biology*, 100, 103225. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103225>
- Falco, L., Sandler, R., Momo, F., Di Ciocco, C., Saravia, L., & Coviella, C. (2015). Earthworm assemblages in different intensity of agricultural uses and their relation to edaphic variables. *PeerJ*, 3, e979. <https://doi.org/10.7717/peerj.979>
- FAO, ITPS, GSBI, SCBD, & EC. (2020). *State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges and potentialities: Report 2020*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cb1928en>
- Ferlian, O., Cesarz, S., Marhan, S., & Scheu, S. (2014). Carbon food resources of earthworms of different ecological groups as indicated by ¹³C compound-specific stable isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.002>
- Ferreira, T., James, S. W., Bartz, M. L. C., De Lima, A. C. R., Dudas, R., & Brown, G. G. (2023). Distribution and diversity of earthworms in different land use systems in Rio Grande do Sul, Brazil. *Zootaxa*, 5255(1), 399–416. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5255.1.32>
- Fonte, S. J., Hsieh, M., & Mueller, N. D. (2023). Earthworms contribute significantly to global food production. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41286-7>

- Fründ, H.-C., Butt, K., Capowiez, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., Potthoff, M., Schädler, M., & Schrader, S. (2010). Using earthworms as model organisms in the laboratory: Recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia*, 53(2), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2009.07.002>
- Gilbert, K. J., Fahey, T. J., Maerz, J. C., Sherman, R. E., Bohlen, P., Dombroskie, J. J., Groffman, P. M., & Yavitt, J. B. (2014). Exploring carbon flow through the root channel in a temperate forest soil food web. *Soil Biology and Biochemistry*, 76, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.005>
- Grosso, E., & Brown, G. (2007). Biodiversidad y ecología de las lombrices de tierra en el Uruguay. In *Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia*. Londrina: Embrapa Soja, 2007.
- Grosso, E., Jorge, G., & Brown, G. G. (2006). *Exotic and Native Earthworms in Various Land Use Systems of Central, Southern and Eastern Uruguay*.
- Guhra, T., Stolze, K., Schweizer, S., & Totsche, K. U. (2020). Earthworm mucus contributes to the formation of organo-mineral associations in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 145, 107785. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107785>
- Hallam, J., Berdeni, D., Grayson, R., Guest, E. J., Holden, J., Lappage, M. G., Prendergast-Miller, M. T., Robinson, D. A., Turner, A., Leake, J. R., & Hodson, M. E. (2020). Effect of earthworms on soil physico-hydraulic and chemical properties, herbage production, and wheat growth on arable land converted to ley. *Science of The Total Environment*, 713, 136491. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136491>
- Hallam, J., & Hodson, M. E. (2020). Impact of different earthworm ecotypes on water stable aggregates and soil water holding capacity. *Biology and Fertility of Soils*, 56(5), 607–617. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01432-5>
- Hendriksen, N. B. (1990). Leaf litter selection by detritivore and geophagous earthworms. *Biology and Fertility of Soils*, 10(1), 17–21. <https://doi.org/10.1007/BF00336119>
- Hoang, D. T. T., Pausch, J., Razavi, B. S., Kuzyakova, I., Banfield, C. C., & Kuzyakov, Y. (2016). Hotspots of microbial activity induced by earthworm burrows, old root channels, and their combination in subsoil. *Biology and Fertility of Soils*, 52(8), 1105–1119. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1148-y>
- Huang, J., Zhang, W., Liu, M., Briones, M. J. I., Eisenhauer, N., Shao, Y., Cai, X., Fu, S., & Xia, H. (2015). Different impacts of native and exotic earthworms on rhizodeposit carbon sequestration in a subtropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.011>
- Huang, W., González, G., & Zou, X. (2020). Earthworm abundance and functional group diversity regulate plant litter decay and soil organic carbon level: A global meta-analysis. *Applied Soil Ecology*, 150, 103473. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103473>

- Jackson, R. B., Lajtha, K., Crow, S. E., Hugelius, G., Kramer, M. G., & Piñeiro, G. (2017). The Ecology of Soil Carbon: Pools, Vulnerabilities, and Biotic and Abiotic Controls. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 419–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054234>
- James, S. W. (1991). Soil, Nitrogen, Phosphorus, and Organic Matter Processing by Earthworms in Tallgrass Prairie. *Ecology*, 72(6), 2101–2109. <https://doi.org/10.2307/1941562>
- James, S. W., & Brown, G. G. (2006). Earthworm ecology and diversity in Brazil. In F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira, & L. Brussaard (Eds.), *Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems*. CABI.
- Jorge Escudero, G., Lagerlöf, J., Martínez Debat, C., & Pérez, C. A. (2019). Identification of Earthworm Species in Uruguay Based on Morphological and Molecular Methods. *Agrociencia*, 23(1). <https://doi.org/10.31285/AGRO.23.1.12>
- Jorge-Escudero, G., Ligrone, A., Lagerlöf, J., Martínez, C., Cadenazzi, M., & Pérez, C. A. (2024). Land use effect on dominance of native and exotic earthworm species in two contrasting rural landscapes. *European Journal of Soil Biology*, 122, 103618. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2024.103618>
- Jorge-Escudero, G., Pérez, C. A., Friberg, H., Söderlund, S., Vero, S., Garmendia, G., & Lagerlöf, J. (2021). Contribution of anecic and epigeic earthworms to biological control of *Fusarium graminearum* in wheat straw. *Applied Soil Ecology*, 166, 103997. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103997>
- Kéry, M., & Royle, J. A. (2015). *Applied hierarchical modeling in ecology: Analysis of distribution, abundance and species richness in R and BUGS*. Academic Press. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282273291944960>
- Lagerlöf, J., Pålsson, O., & Arvidsson, J. (2012). Earthworms influenced by reduced tillage, conventional tillage and energy forest in Swedish agricultural field experiments. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 62(3), 235–244. <https://doi.org/10.1080/09064710.2011.602717>
- Lavallee, J. M., Soong, J. L., & Cotrufo, M. F. (2019). Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Global Change Biology*, gcb.14859. <https://doi.org/10.1111/gcb.14859>
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P., & Rossi, J.-P. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, 42, S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.10.002>
- Lavelle, P., & Spain, A. (2002). *Soil Ecology* (Springer Science&Business Media).
- Le Couteulx, A., Wolf, C., Hallaire, V., & Pérès, G. (2015). Burrowing and casting activities of three endogeic earthworm species affected by organic matter location. *Pedobiologia*, 58(2–3), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2015.04.004>

- Ligrone, A., Alvarez, M., Jorge-Escudero, G., & Piñeiro, G. (2024). Seasonal dynamics of agricultural land use impacts on earthworm communities: Insights into diversity, abundance, and functional composition. *European Journal of Soil Biology*, 120, 103588. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2023.103588>
- Lubbers, I. M., van Groenigen, K. J., Fonte, S. J., Six, J., Brussaard, L., & van Groenigen, J. W. (2013). Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change*, 3(3), 187–194. <https://doi.org/10.1038/nclimate1692>
- M. B. Bouché. (1977). Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins*.
- Marhan, S., Langel, R., Kandeler, E., & Scheu, S. (2007). Use of stable isotopes (^{13}C) for studying the mobilisation of old soil organic carbon by endogeic earthworms (Lumbricidae). *European Journal of Soil Biology*, 43, S201–S208. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.017>
- Medina-Sauza, R. M., Álvarez-Jiménez, M., Delhal, A., Reverchon, F., Blouin, M., Guerrero-Analco, J. A., Cerdán, C. R., Guevara, R., Villain, L., & Barois, I. (2019). Earthworms Building Up Soil Microbiota, a Review. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 81. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00081>
- Pey, B., Nahmani, J., Auclerc, A., Capowiez, Y., Cluzeau, D., Cortet, J., Decaëns, T., Deharveng, L., Dubs, F., Joimel, S., Briard, C., Grumiaux, F., Laporte, M.-A., Pasquet, A., Pelosi, C., Pernin, C., Ponge, J.-F., Salmon, S., Santorufo, L., & Hedde, M. (2014). Current use of and future needs for soil invertebrate functional traits in community ecology. *Basic and Applied Ecology*, 15(3), 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2014.03.007>
- Phillips, H. R. P., Bach, E. M., Bartz, M. L. C., Bennett, J. M., Beugnon, R., Briones, M. J. I., Brown, G. G., Ferlian, O., Gongalsky, K. B., Guerra, C. A., König-Ries, B., Krebs, J. J., Orgiazzi, A., Ramirez, K. S., Russell, D. J., Schwarz, B., Wall, D. H., Brose, U., Decaëns, T., ... Eisenhauer, N. (2021). Global data on earthworm abundance, biomass, diversity and corresponding environmental properties. *Scientific Data*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00912-z>
- Phillips, H. R. P., Guerra, C. A., Bartz, M. L. C., Briones, M. J. I., Brown, G., Crowther, T. W., Ferlian, O., Gongalsky, K. B., Krebs, J., Orgiazzi, A., Routh, D., Schwarz, B., Bach, E. M., Bennett, J., Brose, U., Decaëns, T., König-Ries, B., Loreau, M., Mathieu, J., ... Nuzzo, V. (2019). *Global distribution of earthworm diversity*. 8.
- Piñeiro, G., Paruelo, J. M., Jobbágy, E. G., Jackson, R. B., & Oesterheld, M. (2009). Grazing effects on belowground C and N stocks along a network of cattle exclosures in temperate and subtropical grasslands of South America: GRAZING AND BELOWGROUND C AND N STOCKS. *Global Biogeochemical Cycles*, 23(2), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2007GB003168>
- Pinto, P., Fernández Long, M. E., & Piñeiro, G. (2017). Including cover crops during fallow periods for increasing ecosystem services: Is it possible in croplands of Southern South America? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 248, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.028>

Pinto, P., Rubio, G., Gutiérrez, F., Sawchik, J., Arana, S., & Piñeiro, G. (2021). Variable root:shoot ratios and plant nitrogen concentrations discourage using just aboveground biomass to select legume service crops. *Plant and Soil*, 463(1–2), 347–358. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04916-x>

Putz, B., Drapela, T., Wanek, W., Schmidt, O., Frank, T., & Zaller, J. G. (2011). A simple method for *in situ* -labelling with ¹⁵ N and ¹³ C of grassland plant species by foliar brushing: *Plant ¹⁵ N and ¹³ C foliar labelling . Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 326–332. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00072.x>

R Core Team. (2022). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Räty, M. (2004). Growth of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* in an acid forest soil, and their effects on enchytraeid populations and soil properties. *Pedobiologia*, 48(4), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2004.03.006>

Righi, G. (1990). *Minhocas de mato grosso e rondonia*. <https://repositorio.usp.br/item/000806815>

Sanabria, M., Velazco, V., Tolosa, G., Falco, L., & Coviella, C. (2023). A georeferenced database of the edaphic biota currently available for Argentina. *Biodiversity Data Journal*, 11, e113079. <https://doi.org/10.3897/BDJ.11.e113079>

Sánchez-de León, Y., Lugo-Pérez, J., Wise, D. H., Jastrow, J. D., & González-Meler, M. A. (2014). Aggregate formation and carbon sequestration by earthworms in soil from a temperate forest exposed to elevated atmospheric CO₂: A microcosm experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.023>

Scheu, S. (1987). Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (Lumbricidae). *Biology and Fertility of Soils*, 5(3), 230–234. <https://doi.org/10.1007/BF00256906>

Schmidt, M. W. I., Torn, M. S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I. A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D. A. C., Nannipieri, P., Rasse, D. P., Weiner, S., & Trumbore, S. E. (2011). Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478(7367), 49–56. <https://doi.org/10.1038/nature10386>

Schönholzer, F., Kohli, L., Hahn, D., Daniel, O., Goez, C., & Zeyer, J. (1998). Effects of decomposition of leaves on bacterial biomass and on palatability to *Lumbricus terrestris* L. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1805–1813. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00049-2)

Smith, P., Cotrufo, M. F., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P. J., Elliott, J. A., McDowell, R., Griffiths, R. I., Asakawa, S., Bustamante, M., House, J. I., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P. C., Gerber, J. S., Clark, J. M., Adhya, T., Scholes, R. J., & Scholes, M. C. (2015). Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. *SOIL*, 1(2), 665–685. <https://doi.org/10.5194/soil-1-665-2015>

- Sokol, N. W., & Bradford, M. A. (2019). Microbial formation of stable soil carbon is more efficient from belowground than aboveground input. *Nature Geoscience*, 12(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0258-6>
- Sokol, N. W., Foley, M. M., Blazewicz, S. J., Bhattacharyya, A., DiDonato, N., Estera-Molina, K., Firestone, M., Greenlon, A., Hungate, B. A., Kimbrel, J., Lique, J., Lafler, M., Marple, M., Nico, P. S., Paša-Tolić, L., Slessarev, E., & Pett-Ridge, J. (2024). The path from root input to mineral-associated soil carbon is dictated by habitat-specific microbial traits and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 193, 109367. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2024.109367>
- Sokol, N. W., Kuebbing, Sara. E., Karlsen-Ayala, E., & Bradford, M. A. (2019). Evidence for the primacy of living root inputs, not root or shoot litter, in forming soil organic carbon. *New Phytologist*, 221(1), 233–246. <https://doi.org/10.1111/nph.15361>
- Sokol, N. W., Sanderman, J., & Bradford, M. A. (2019). Pathways of mineral-associated soil organic matter formation: Integrating the role of plant carbon source, chemistry, and point of entry. *Global Change Biology*, 25(1), 12–24. <https://doi.org/10.1111/gcb.14482>
- Soriano, A. (1992). Natural grasslands: Introduction and western hemisphere. In R. T. Coupland (Ed.), *Ecosystems of the world*. Elsevier.
- Sulkava, P., & Huhta, V. (2003). Effects of hard frost and freeze-thaw cycles on decomposer communities and N mineralisation in boreal forest soil. *Applied Soil Ecology*, 22(3), 225–239. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00155-5)
- Szlavec, K., Chang, C.-H., Bernard, M. J., Pitz, S. L., Xia, L., Ma, Y., McCormick, M. K., Filley, T., Yarwood, S. A., Yesilonis, I. D., & Csuzdi, C. (2018). Litter quality, dispersal and invasion drive earthworm community dynamics and forest soil development. *Oecologia*, 188(1), 237–250. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4205-4>
- Thomas, E., Prabha, V. S., Kurien, V. T., & Thomas, A. P. (2020). The potential of earthworms in soil carbon storage: A review. *Environmental & Experimental Biology*, 18(2), 61. <https://doi.org/10.22364/eeb.18.06>
- UICN. (2020). *Global Standard for Nature-based Solutions. A user-friendly framework for the verification, design and scaling up of NbS* (1st ed.).
- van Groenigen, J. W., Lubbers, I. M., Vos, H. M. J., Brown, G. G., De Deyn, G. B., & van Groenigen, K. J. (2015). Earthworms increase plant production: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 4(1), 6365. <https://doi.org/10.1038/srep06365>
- Vidal, A., Quenea, K., Alexis, M., Nguyen Tu, T. T., Mathieu, J., Vaury, V., & Derenne, S. (2017). Fate of 13 C labelled root and shoot residues in soil and anecic earthworm casts: A mesocosm experiment. *Geoderma*, 285, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.09.016>
- Vidal, A., Watteau, F., Remusat, L., Mueller, C. W., Nguyen Tu, T.-T., Buegger, F., Derenne, S., & Quenea, K. (2019). Earthworm Cast Formation and Development: A Shift From Plant Litter to Mineral Associated Organic Matter. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 55. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00055>

- Villarino, S. H., Pinto, P., Jackson, R. B., & Piñeiro, G. (2021). Plant rhizodeposition: A key factor for soil organic matter formation in stable fractions. *Science Advances*, 7(16), eabd3176. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3176>
- Zerbino, S. (2007). Evaluación de la biomasa de lombrices de tierra en diferentes sistemas de producción del Uruguay. In *Minhocas na América Latina biodiversidade e ecologia*.
- Zerbino, S. (2010). Evaluación de la macrofauna del suelo en rotaciones cultivos-pasturas con laboreo convencional. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.)*, 26, 189–202. <https://doi.org/10.21829/azm.2010.262887>
- Zerbino, S. (2011). La macrofauna del suelo y su relación con la heterogeneidad florística. In *BASES ECOLÓGICAS Y TECNOLÓGICAS PARA EL MANEJO DE PASTIZALES*.
- Zerbino, S. (2012). Efecto de rotaciones cultivo-pasturas en siembra directa, con pastoreo, sobre comunidades de Oligochaeta. *Agrociencia (Uruguay)*, 16(1), 15–23.
- Zerbino, S., & Morón, A. (2003). *Macrofauna del suelo y su relación con propiedades físicas y químicas en rotaciones cultivo-pastura*.
- Zhang, W., Hendrix, P. F., Dame, L. E., Burke, R. A., Wu, J., Neher, D. A., Li, J., Shao, Y., & Fu, S. (2013). Earthworms facilitate carbon sequestration through unequal amplification of carbon stabilization compared with mineralization. *Nature Communications*, 4(1), 2576. <https://doi.org/10.1038/ncomms3576>
- Zheng, Y., Wang, S., Bonkowski, M., Chen, X., Griffiths, B., Hu, F., & Liu, M. (2018). Litter chemistry influences earthworm effects on soil carbon loss and microbial carbon acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 123, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.012>
- Zhu, X., Hu, Y., Li, Z., & Wu, D. (2021). Earthworms promote the accumulation of rhizodeposit carbon to soil macroaggregate in a Mollisol of Northeast China, primarily in long-term no-till soil. *Soil Ecology Letters*, 3(2), 84–93. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0062-2>