



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía - Programa de Magister en Ciencias Agronómicas



**ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO COMO
HERRAMIENTA PREDICTIVA ALTERNATIVA EN LA
DETERMINACION DE ABUNDANCIA DE
¹³C EN SUELOS.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agronómicas con mención en Ciencias del Suelo y Recursos Naturales.

MARIA DE LOS ANGELES SEPULVEDA PARADA
CHILLÁN-CHILE
2020

Profesor Guía: Erick Zagal Venegas
Dpto. de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción



ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO COMO
HERRAMIENTA PREDICTIVA ALTERNATIVA EN LA
DETERMINACION DE ABUNDANCIA DE ^{13}C EN SUELOS.

Aprobada por:

Erick Zagal Venegas
Ing. Agrónomo, Ph. D.

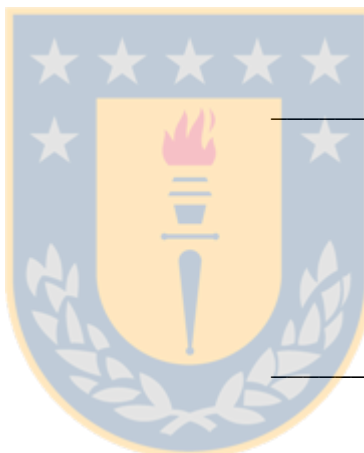
Profesor Guía

Cristina Muñoz Vargas
Ing. Agrónomo, Dra. Cs.

Evaluadora Interna

Manuel Casanova Pinto
Ing. Agrónomo, M.Sc.

Evaluador Externo



Macarena Gerding González
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Directora Programa

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a Dios por bendecirme con la posibilidad de realizarme personal y profesionalmente, encontrando en las Ciencias del Suelo mi camino en las ciencias aplicadas. Así también gracias por haber sido bendecida con una familia que me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado y me han alentado día tras día para cumplir mis metas.

Gracias a mi padre Walter Sepúlveda, por enseñarme a jamás claudicar; a mi madre Morelia Parada, por incentivar me a ir siempre más allá; a mi hermano José Ignacio Sepúlveda, por su amistad incondicional que me ha ayudado a salir adelante siempre; a Felipe, por su ilimitada paciencia e incondicional amor, ha sido un pilar fundamental para ir creciendo juntos en todos los ámbitos. Mi eterna gratitud y admiración para todos ellos porque su amor y apoyo ha sido fundamentales para perseverar en mis sueños y entender que todo es posible.

A mi profesor guía, Dr. Erick Zagal, gracias por creer en mí y darme esta oportunidad. Su impulso, tiempo, dedicación y constante retroalimentación de todos los temas que hemos discutido han permitido ampliar mis horizontes y reencontrarme con mis aspiraciones iniciales. Así también agradezco a los profesores del Departamento de Suelos que me han apoyado y entregado generosamente sus conocimientos y buenos consejos.

Al Sindicato N°3 de la Universidad de Concepción, porque me brindaron el apoyo económico esencial para concretar mis estudios y así también me han incentivado para culminar con éxito este proceso.

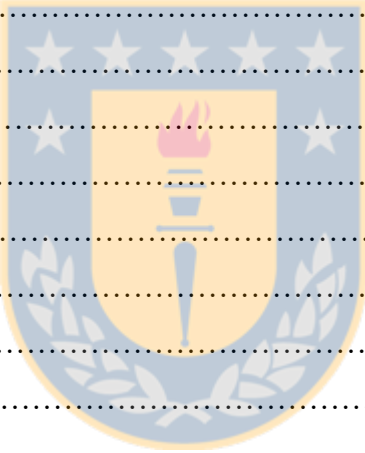
Este proyecto de tesis de postgrado fue financiado gracias al Gobierno de Chile a través del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT Regular N°1161492.

A la Facultad de Agronomía por otorgarme el permiso para continuar creciendo como profesional y aplicar todo lo aprendido en este programa, en la hermosa tarea que se desarrolla continuamente en el Laboratorio Químico de Suelos y Plantas. Agradezco enormemente a mi laboratorio, conformado por Angelie, Ariel, Claudia Jarpa y Claudia Rivera, han sido un gran apoyo durante este proceso, valoré y valoro cada día la paciencia que han tenido durante este periodo.

Así también agradecer a Katherine, Marcela y Paula por contribuir, con su trabajo y dedicación, al desarrollo exitoso de este proyecto en todos sus ámbitos.

Esta tesis está dedicada a mi hija, Trinidad Quinteros Sepúlveda, que me acompañó durante todo mi segundo año de magíster. Tenerla a mi lado fue la mejor motivación que pude encontrar.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Introducción General.....	1
Hipótesis	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
Referencias.....	6
Capítulo 1: Artículo enviado a revista Geoderma Regional	
Near infrared spectroscopy a new approach to estimate stable carbon isotopes in a wide variety of soil profiles.	
Abstract.....	10
Introduction.....	11
Materials and Methods.....	13
Results.....	15
Discussion.....	17
Conclusions.....	18
Acknowledgements.....	18
References.....	19
	
Conclusiones generales.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figure 1 Flowchart of the model construction process (source: own elaboration)	24
Figure 2 Measured versus predicted $\delta^{13}\text{C}$ values for six and nine latent variables (source: own elaboration)	25
Figure 3 Latent variables and the associated root mean square error of cross validation (RMSECV) values (source: own elaboration) ...	26
Table 1 Description of the eleven sites used for the calibration and validation of the predictive model (source: own elaboration)	27
Table 2 Chemical and physical properties of the eleven sites used for model construction (source: own elaboration)	28
Table 3 Calibration and external validation performance values for selected models (source: own elaboration)	29
Table 4 Prediction of soil ^{13}C estimates at ten additional sites (source: own elaboration)	30
Table 5 Description of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model (source: own elaboration).....	31
Table 6 Chemical and physical properties of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model (source: own elaboration).....	32

INTRODUCCION

El clima es un sistema interactivo, donde la atmósfera, la superficie de la Tierra y los seres vivos tienen participación. Han surgido múltiples estudios acerca de las nuevas dinámicas en torno al cambio que está sufriendo el clima y los efectos que podrían tener estos cambios sobre el planeta (Le Treut *et al.*, 2007). El principal efecto estudiado por investigadores de distintas disciplinas, es el del calentamiento global que calculado a partir de una tendencia lineal, muestra un aumento de 0,85 °C, en la temperatura media de la Tierra en el periodo de 1880-2012 (IPCC, 2013).

Los principales causantes de este efecto serían el aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) como el dióxido de carbono (CO₂), clorofluorocarbonos (CFC), óxido nitroso (N₂O), metano (CH₄), vapor de agua, entre otros (IPCC, 2007). Este aumento estaría asociado a un incremento en las actividades industriales, al cambio de uso del suelo, al mayor uso de combustibles fósiles y en general a las emisiones antropogénicas de GEI, en gran medida como resultado del crecimiento económico y demográfico (IPCC, 2013).

Si bien los gases más abundantes en la atmósfera son nitrógeno (N₂) y oxígeno (O₂), ninguno de ellos es causal directa en el calentamiento global, pero sí lo son el aumento dramático de CO₂, N₂O y CH₄, considerados como la principal causa de este suceso (IPCC, 2013). Esto debido a que actúan como un manto que cubre la superficie terrestre, atrapando la energía solar que se refleja de ella y evitan que gran parte sea liberada, este fenómeno se conoce como efecto invernadero (Le Treut *et al.*, 2007)

Se ha observado que uno de los GEI que ha aumentado en mayor medida sus niveles es CO₂ y lo ha hecho en un 40% con respecto a la época previa de la revolución industrial. Aunque hay evidencia de que esta sería la tendencia, el balance entre los mecanismos del ciclo del C, aún permanece incierta y las estimaciones en investigaciones en cuanto a reservorios de C en el suelo se limitan a experimentos en sitios aislados y específicos, y por lo mismo, esto no logra revelar los efectos concretos de este fenómeno (Crowther *et al.*, 2016). Es por eso que el intercambio de C entre el suelo y la atmósfera representa un mecanismo preponderante que debe ser estudiado.

Los suelos del mundo contienen un reservorio estimado de 2.500 Pg C (10¹⁵ g -billones de toneladas métricas-), que corresponde a 3,3 veces más que la cantidad de C que hay en la atmósfera (Lal, 2006). Frente a esta información, parece importante preguntarse acerca del rol que se espera que el suelo cumpla en el estado actual, pues podemos observar que, así como el suelo puede actuar como captador de C, también podría actuar como fuente emisora de C, según sean las condiciones climáticas (Carvalhais *et al.*, 2014).

El carbono orgánico del suelo (COS), conforma una gran reserva de C en el ecosistema terrestre, pero la información con la que se cuenta acerca del intercambio de C entre la atmósfera y el suelo es muy variada, por lo que se necesita continuar los estudios en esta materia para lograr comprender mejor la dinámica que allí ocurre. Se requiere estudios de mapeo más extensivos y confiable para monitorear, en la actualidad, los cambios los reservorios orgánicos del suelo (Brickley et al., 2005; Mooney et al., 2004). Gran parte de la información que encontramos disponible hoy, se basa en el estudio de las capas superficiales del suelo; la cantidad de materia orgánica y la dinámica del C han sido estudiadas durante mucho tiempo, pero en la última década, se ha incentivado el estudio de los horizontes más profundos, convirtiéndose en objeto de investigación. Esto se debe principalmente a que se ha reconocido que el C del subsuelo contribuye en gran medida a las reservas totales de este. Poco se sabe acerca de los factores que controlan la estabilidad del C en las capas profundas del suelo, por lo que mejorar el conocimiento de estos factores es esencial para comprender los cambios que ocurren en sus dinámicas y su relación en las variaciones de CO₂ atmosférico (Chabbi *et al.*, 2009; Rumpel *et al.*, 2002; Fontaine *et al.*, 2007).

Los factores climáticos controlan la degradación de COS (Carvalhais *et al.*, 2014), donde la temperatura es un factor importante debido a la sensibilidad del COS en función de su variación (Doetterl *et al.*, 2015). Por otro lado, existen factores geoquímicos que ayudan en la estabilización de la materia orgánica del suelo (MOS). Últimamente se ha destacado las interacciones que puede existir entre factores climáticos y geoquímicos en el control del almacenamiento de C en los suelos (Doetterl *et al.*, 2015), como patrones de gran escala y dinámicas del ambiente que deben ser considerados. A raíz de lo anterior, se ha demostrado que el clima tiene efectos sobre la dinámica del COS en el suelo dado principalmente por la influencia que tiene sobre la geoquímica de los suelos, revelando así lo importante que serían las características pedológicas y la variabilidad de los suelos, como influencia sobre la estabilización del C del suelo. Así los tipos de suelos, tendrían una influencia en la estabilización del C, siendo un punto importante incluir diversidad de tipos de suelos para los estudios que se llevan a cabo.

Mecanismos de degradación y estabilidad del carbono orgánico del suelo: aproximaciones metodológicas.

Actualmente poco se conoce sobre los mecanismos de degradación y estabilidad del COS, en los horizontes más profundos, y es necesario hacer mayores estudios ya que entre un 46 y un 63% del C estable total se almacena en estos estratos (20-100 cm) (Jobbagy y Jackson, 2000).

Existe abundante información acerca de las metodologías que se utilizan para el estudio de la dinámica del C y la mayoría de ellas apunta a técnicas isotópicas que determinan presencia de ^{13}C (Balesdent y Mariotti, 1996; Glaser, 2005; Trumbore, 2009). El estudio de la composición isotópica de C se expresa como abundancia natural de ^{13}C (proporción o relación $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$), que es generalmente expresada como $\delta^{13}\text{C}$, en partes por mil (‰), y se determina midiendo la cantidad relativa de ^{13}C en una muestra y expresando la tasa relativa de presencia de este isótopo utilizando como muestra de referencia para este caso el estándar V-PDB (Vienna – Pee Dee Belemnite) (Chen *et al.*, 2005). De este modo, la muestra con mayor cantidad de ^{13}C tendrá un $\delta^{13}\text{C}$ más positivo, en comparación con el estándar, y será más negativa si la diferencia es mayor con respecto al estándar. La mayor parte de la MOS contiene menor cantidad de ^{13}C que el estándar, entregando valores negativos (Andriulo *et al.*, 2002). El $\delta^{13}\text{C}$ de la MOS es comparable a aquel del material vegetal de origen como es el caso de especies C4 como el maíz; praderas de gramíneas o leguminosas tropicales el valor $\delta^{13}\text{C}$ es aproximadamente -12 ‰, mientras que en especies C3 como el trigo, arroz; praderas gramíneas o leguminosas temperadas este será aproximadamente -26‰. La descomposición microbiana y las características pedológicas, entre otras, propician un aumento de $\delta^{13}\text{C}$ entre el 1 – 3‰ a mayor profundidad del suelo (Krull y Skjemstad, 2002).

Accoe *et al.* (2003) han encontrado que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y su incremento en el perfil del suelo podrían ser utilizados como un indicador del potencial de degradación o de la estabilidad de la MOS (en términos de las constantes de velocidad de descomposición). Esto es atribuido a que los microorganismos prefieren moléculas agotadas en ^{13}C para la respiración y las moléculas enriquecidas con ^{13}C son utilizadas en la producción de biomasa, lo cual puede producir un enriquecimiento de ^{13}C en la materia orgánica residual. Así, la determinación isotópica de C en suelo, y consecuentemente la dinámica de su fraccionamiento, es una determinación importante para los grupos de investigación que estudian los factores relacionados al intercambio gaseoso de CO_2 , que participa del calentamiento global. La Espectroscopia de Masa de Relaciones Isotópicas (del Inglés: *Isotope Ratio Mass Spectrometer*, IRMS) es la metodología utilizada para determinar la abundancia de diferentes isótopos de N, O y C (Balesdent, & Mariotti, 1996; Glaser, 2005; Trumbore, 2009). Es bastante compleja y necesita tanto de equipamiento como personal altamente

capacitados para las determinaciones (Doetterl *et al.*, 2013; Winowiecki *et al.*, 2017). El proceso de combustión de la muestra y los analizadores, tienen costos asociados altos, por lo que limita la cantidad de muestras que se pueden analizar.

El estudio de indicadores que permitan explicar el rol que cumple el suelo como fuente o reservorio de C y sus posibles efectos en el calentamiento global puede incluir el análisis del perfil del suelo en diferentes condiciones edafoclimáticas (Crowther *et al.*, 2016) como fuente de información importante para comprender la dinámica del C. La extensión y variabilidad de condiciones edafoclimáticas encontradas en Chile, otorgan un amplio espectro de posibilidades para la investigación de procesos y patrones relacionados con la dinámica del C en ecosistemas. Sin embargo, los costos de análisis de $\delta^{13}\text{C}$ por IRMS en estos escenarios, aumenta dramáticamente, debido al elevado número de muestras que conlleva, lo cual dificulta el levantamiento de información necesaria para entender el intercambio de C atmósfera-suelo y demanda una aproximación metodológica más sencilla y económica que viabilice estos estudios.

La Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (del Inglés: *Near Infra Red Spectrophotometer, NIRS*) es una herramienta para el análisis de las propiedades del suelo que ha reportado excelentes resultados en la determinación cuantitativa del COS (Viscarra Rossel *et al.*, 2006). Se ha demostrado que esta metodología puede predecir la cantidad de isótopos estables del carbono en el suelo (Fuentes *et al.* 2012; Doetterl *et al.*, 2013; Winowiecki *et al.*, 2017). Principalmente existen antecedentes acerca del poder predictivo de NIRS en material vegetal, en cuanto a la determinación de contenido de C, N, lignina, celulosa, entre otros. Ha tenido excelentes resultado y correlación con las metodologías tradicionales (Black & Panozzo, 2001; Petisco *et al.*, 2006; Kleinebecker *et al.*, 2009), pero es necesario mayor información sobre la predicción de estos isótopos en el suelo debido a que aún es escasa.

Investigaciones previas han logrado predecir $\delta^{13}\text{C}$ en suelos (Fuentes *et al.* 2012; Doetterl *et al.*, 2013; Winowiecki *et al.*, 2017). Estos antecedentes indican que el uso del NIRS permite desarrollar modelos predictivos para la estimación de $\delta^{13}\text{C}$ en suelos y aumentar el volumen de las muestras analizadas, obteniendo buenos modelos predictivos y correlación entre métodos. Fuentes *et al.* (2012) han trabajado con esta nueva herramienta pero sólo han considerado un tipo de suelo y de uso agrícola, por tanto no se consideran las variaciones físicas y químicas que puede existir con distintos suelos. Por otro lado, Winowiecki *et al.*, (2017), ampliaron la cantidad de sitios estudiados (9 en total en África del Este) y consideró diferentes clases de vegetación, que pueden afectar el contenido de C en el suelo; sin embargo concluyeron que es necesario aumentar la cantidad de muestras de suelo analizadas a través de esta técnica, para desarrollar un modelo predictivo más robusto.

Las diferentes condiciones edafoclimáticas de Chile, ofrecen una oportunidad de generar un modelo predictivo de C para estimar la abundancia de ^{13}C , a través de un transecto amplio (aproximadamente 4000 kms), considerando además, la predicción de isotopos de C en diferentes profundidades del perfil del suelo. De esta forma, será posible aumentar la robustez del método NIRS y su validación para diversos suelos.

HIPOTESIS

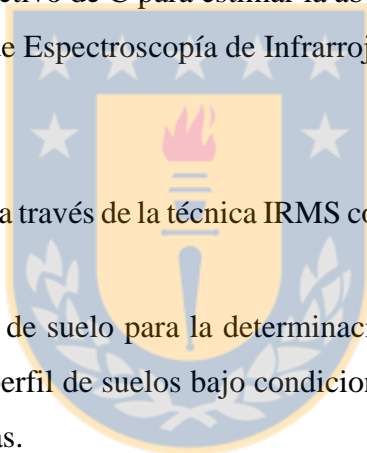
La metodología analítica de Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS) conforma una aproximación válida para estimar la abundancia natural de ^{13}C en diferentes series de suelos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un modelo predictivo de C para estimar la abundancia de ^{13}C en diferentes series de suelos utilizando la técnica analítica de Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calibrar la técnica analítica de NIRS a través de la técnica IRMS como referente, para evaluar el potencial de predicción de $\delta^{13}\text{C}$ en suelos.
- Validar técnica NIRS con muestras de suelo para la determinación de abundancia natural de ^{13}C para diferentes tipos y profundidades del perfil de suelos bajo condiciones naturales de vegetación de pradera y distintas condiciones edafoclimáticas.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Accoe, F., Boeckx, P., Cleemput, O. V., Hofman, G. 2003. Relationship between soil organic C degradability and the evolution of the $\delta^{13}\text{C}$ signature in profiles under permanent grassland. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(23): 2591-2596.
- Andriulo, A. E., Balesdent, J., Guillemot J., Cordone, G. 2002. Abundancia natural en ^{13}C y ^{14}C de suelo en relación a los cambios ambientales del Holoceno tardío en la región de Pampeana húmeda. *Revista Ciencias Agrarias*, 1(1): 7-25.
- Balesdent, J., Mariotti, A. 1996. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. p. 83-111. In Boutton, T.W. and Yamasaki, S.I. (Eds.) *Mass Spectrometry of Soils*. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Black, C., Panozzo, J. 2001. Utilising Near Infrared Spectroscopy for Predicting Malting Quality in Whole Grain Barley and Whole Grain Malt. P. 1-5. In Conference 2001: A Barley Odyssey, the 10th Australian Barley Technical Symposium.
- Brickleymer, R. S., Miller, P. R., Paustian, K., Keck, T., Nielsen, G. A., Antle, J. M. 2005. Soil organic carbon variability and sampling optimization in Montana dryland wheat fields. *Journal of Soil and Water Conservation* 60, 42–51.
- Carvalhais, N., Forkel, M., Khomik, M., Bellarby, J., Jung, M., Migliavacca, M., Reichstein, M. 2014. Global covariation of carbon turnover times with climate in terrestrial ecosystems. *Nature*, 514: 213-217.
- Chabbi, A., Kögel-Knabner, I., Rumpel, C. 2009. Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 256–261.
- Chen, Q., Shen, C., Sun, Y., Peng, S., Yi, W., Li, Z. A., Jiang, M. 2005. Spatial and temporal distribution of carbon isotopes in soil organic matter at the Dinghushan Biosphere Reserve, South China. *Plant and Soil*, 273(1-2): 115-128.

- Crowther, K. E., Todd-Brown, O., W. Rowe, C., Wieder, W. R., Carey, J. C., Machmuller, M. B., Snoek, B. L., Fang, S., Zhou, G., Allison, S. D., Blair, J. M., Bridgham, S. D., Burton, A. J., Carrillo, Y., Reich, P. B., Clark, J. S., Classen, A. T., Dijkstra, F. A., Elberling, B., Emmett, B. A., Estiarte, M., Frey, S. D., Guo, J., Harte, J., Jiang, L., Johnson, B. R., Kröel-Dulay, G., Larsen, K. S., Laudon, H., Lavallee, J. M., Luo, Y., Lupascu, M., Ma, L. N., Marhan, S., Michelsen, A., Mohan, J., Niu, S., Pendall, E., Peñuelas, J., Pfeifer-Meister, L., Poll, C., Reinsch, S., Reynolds, L. L., K. Schmidt, I., Sistla, S., Sokol, N. W., Templer, P. H., Treseder, K. K., Welker, J. M., Bradford, M. A.. 2016. Quantifying global soil carbon losses in response to warming. *Nature Letter Research*, 540: 104-108.
- Doetterl, S., Stevens, A., Six, J, Merckx, R., Van Oost, K., Casanova Pinto, M., Casanova-Katny, A., Muñoz, C., Boudin, M., Zagal Venegas, E. Boeckx, P. 2015. Soil carbon storage controlled by interactions between geochemistry and climate. *Nature Geoscience*, 8: 780-783.
- Doetterl, S., Stevens, A., Van Oost, K., van Wesemael, B. 2013. Soil Organic Carbon Assessment at High Vertical Resolution using Closed-Tube Sampling and Vis-NIR Spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, 77(4): 1430
- Fontaine, S., Barot, S., Barre, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C. 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–281.
- Fuentes, M., Hidalgo, C., González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Govaerts, B., Sayre, K. D., Etchevers, J. 2012. NIR spectroscopy: An alternative for soil analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(1-2): 346-356.
- Glaser, B. 2005. Compound-specific stable-isotope ($\delta^{13}\text{C}$) analysis in soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(5): 633-648.
- IPCC. 2007. Climate change 2007: The physical science basis. Summary for policymakers. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) XXX p. In S. Solomon *et al.* (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- IPCC. 2013. Climate change 2013: The physical science basis. Summary for policymakers. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) XXX p. In S. Solomon *et al.* (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Jobbágy, E. G., Jackson, R. B. 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications*, 10(2): 423-436.
- Kleinebecker, T., Schmidt, S. R., Fritz, C., Smolders, A. J., Hölzel, N. 2009. Prediction of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in plant tissues with near-infrared reflectance spectroscopy. *New Phytologist*, 184(3): 732-739.
- Krull, E. S., Skjemstad, J. O. 2003. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ profiles in ^{14}C -dated Oxisol and Vertisols as a function of soil chemistry and mineralogy. *Geoderma*, 112(1): 1-29.
- Lal, R. 2006. Soil carbon sequestration in Latin America. p. 49-64. In Lal, R. *et al.* (eds.) Carbon sequestration in soils of Latin America. The Haworth Press, Binghamton, New York, USA.
- Le Treut, H., Somerville R., Cubasch U., Ding Y., Mauritzen C., Mokssit A., Peterson T., Prather M. 2007. Historical Overview of Climate Change. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, United Kingdom and New York, USA.
- Mooney, S., Antle, J., Capalbo, S., Paustian, K. 2004. Influence of project scale and carbon variability on the costs of measuring soil carbon credits. *Environmental Management*. 33, S252–S263.
- Petisco, C., García-Criado, B., Mediavilla, S., Vázquez De Aldana, B. R., Zabalgoitia, I., García-Ciudad, A. 2006. Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and non-destructive tool to predict foliar organic constituents of several woody species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (6): 1823-1833.
- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F. 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry* 33, 1131–1142.

Schwartz, D., Mariotti, A., Lanfranchi, R., Guillet, B. 1986. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of soil organic matter as indicators of vegetation change in the Congo. *Geoderma*, 39: 97-103.

Trumbore, S. 2009. Radiocarbon and Soil Carbon Dynamics. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 37 (1): 47-66.

Viscarra Rossel, R. A., Walvoort, D., McBratney, A. B., Janik, L. J., Skjemstad, J. O. 2006. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma*, 131(1-2): 59-75

Winowiecki, L. A., Vågen, T., Boeckx, P., Dungait, J. 2017. Landscape-scale assessments of stable carbon isotopes in soil under diverse vegetation classes in East Africa: application of near-infrared spectroscopy. *Plant and Soil*, 421: 259-272.



CAPÍTULO 1: ARTÍCULO ENVIADO A LA REVISTA GEODERMA REGIONAL

NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY: AN ALTERNATIVE TOOL FOR THE ASSESSMENT OF STABLE CARBON ISOTOPES IN A WIDE VARIETY OF SOIL PROFILES FROM CHILE

María de los Angeles Sepulveda¹, Marcela Hidalgo¹, Juan Araya³, Manuel Casanova², Cristina Muñoz¹, Sebastian Doetterl⁴, Samuel Bodé⁵, Pascal Boeckx⁵, Erick Zagal^{1*}

¹ Department of Soil and Natural Resources, Faculty of Agronomy, University of Concepción, Chile

² Department of Engineering and Soil, Faculty of Agronomics Science, University of Chile, Santiago, Chile

³ Department of Instrumental Analysis, Faculty of Pharmacy, University of Concepción, Chile

⁴ ETH-Zürich, Department of Environmental Systems Science, Zürich, Switzerland

⁵ Department of Green chemistry and technology, Isotope Bioscience Laboratory (ISOFYS), Ghent University, Ghent, Belgium

* Corresponding author: ezagal@udec.cl; Vicente Méndez 595, Chillán, Chile

Abstract

The role of soil in the global carbon cycle and carbon-climate feedback mechanisms have become important topics of research in recent decades. Consequently, the development of simple, rapid, and inexpensive methods to support the study of carbon dynamics in the soil is of great interest. Near-infrared (NIR) spectroscopy has emerged as a rapid and cost-effective method for measuring soil properties. The aim of this study is to develop and validate a predictive model for $\delta^{13}\text{C}$ value using NIR spectroscopy (NIRS) in a wide variety of soil profiles. Eleven sites were selected within a transect in Chile between 30° and 50° S. These sites represent different soil moisture and soil temperature regimes, clay mineralogy, parent materials, and climate; have prairie vegetation conditions; and contain C3-type vegetation. Air-dried soil samples were scanned in the NIR at a resolution of 4 cm^{-1} , and the carbon isotopic composition, expressed as $\delta^{13}\text{C}$ relative to the Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) standard, was analyzed via an elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometer (EA-IRMS) system. A prediction model for $\delta^{13}\text{C}$ values based on NIRS data was established through a partial least-squares regression model, using nine latent variables. The R^2 value for the validation set was 0.79, and the root mean square error prediction was 1.16‰. These parameters of the model performance indicate that NIRS can be used to predict $\delta^{13}\text{C}$

for the selected dataset. The established prediction model was also applied to estimate $\delta^{13}\text{C}$ values in soil profiles from ten additional sites distributed along the transect that were not used in the calibration and validation of the model. The results of this study support the use of NIRS as a predictive tool in soil analysis and as a nondestructive and waste-free methodology for the study of carbon dynamics in soil.

Keywords: Near-infrared spectroscopy, Isotope ratio mass spectrometer, Carbon isotope abundance, $\delta^{13}\text{C}$, Andisols, Alfisols, Inceptisols, Mollisols, Carbon dynamics, Partial least-squares regression

1. Introduction

Soil organic carbon (SOC) represents one of the largest reserves of carbon in terrestrial ecosystems (Lal, 2006). However, studies indicate that the exchange of SOC with the atmosphere can vary depending on climatic conditions, which raises questions whether the soil is a source or sink for atmospheric carbon dioxide (CO_2) (Carvalhais et al., 2014). Therefore, an understanding of SOC dynamics, particularly the process of carbon stabilization, is crucial to predict the role of SOC in the carbon cycle under a changing climate (Crowther et al., 2016). The potential for soil to sequester carbon depends primarily on soil development and the interactions between weathering and biological processes that affect nutrient availability (Doetterl et al., 2018).

Climatic factors control SOC degradation (Carvalhais et al., 2014); on the other hand, geochemical factors stabilize soil organic matter (SOM). The interaction between climatic and geochemical factors on soil carbon storage has been attracting attention (Doetterl et al., 2015). Furthermore, climate, vegetation, and geochemical soil composition affect SOC dynamics (Finke et al., 2019). The influence of parent material on soil geochemistry reveals the importance of the pedological characteristics and, therefore, soil types, as a stabilizing influence on SOC (Finke et al., 2019).

The role of soil in climate change has become an important subject of research; consequently, the development of methodologies to evaluate soil in support of SOC sequestration studies has attracted attention. Intensive and reliable large-scale mapping is required to monitor changes in soil organic pools (Bricklemyer et al., 2005; Mooney et al., 2004). SOM composition and carbon dynamics have been studied in topsoil horizons for a long time; however, for the past decade, subsoil horizons have become a subject of active research because of the recognition that subsoil carbon contributes to the total carbon stocks. To date, less is known about the factors that stabilize carbon in deeper soil layers. Improving our knowledge of these factors is essential to understand the feedback mechanisms between SOC stocks and atmospheric

CO₂ during climate change (Chabbi et al., 2009; Rumpel et al., 2002; Fontaine et al., 2007). Accurate and low-cost methods of soil analysis are required because the number of soil samples typically involved in such studies is large. During the past two decades, visible–near-infrared (vis–NIR) diffuse reflectance spectroscopy has been developed as an easy-to-use methodology, and it is suitable for predicting several soil properties (e.g., % C, % N, pH, and texture) (Viscarra Rossel et al., 2006; Petisco et al., 2006; Zornoza et al., 2008).¹

Many methods exist to study the dynamics of SOC, but techniques that measure the isotopic abundance of ¹³C in SOC are useful to elucidate C-process dynamics (Balesdent, & Mariotti, 1996; Glaser, 2005; Trumbore, 2009; Accoe et al., 2003). Some authors have proposed that the change in ¹³C content in soil profiles can be used as an indicator of the stability of SOM (Accoe et al., 2003). The isotopic ratios of several elements (e.g., carbon, nitrogen, oxygen) in the soil are typically determined using isotope ratio mass spectrometry (IRMS) (Balesdent and Mariotti, 1996; Glaser, 2005; Trumbore, 2009). However, IRMS is complex, requiring both sophisticated equipment and trained personnel, which limits the number of samples that can be analyzed.

Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has many characteristics of interest for agronomic and environmental studies. For example, sample preparation involves only drying and grinding, and the analysis is non-destructive, requiring no hazardous chemicals and only a few seconds to obtain a measurement. Furthermore, NIRS is suitable for analyzing large samples, and multiple soil properties can be estimated from a single scan. In recent years, NIRS has also been used to determine the abundance of stable carbon isotopes in the soil; previous studies have used NIRS to predict $\delta^{13}\text{C}$ in soil (Fuentes et al. 2012; Winowiecki et al., 2017). These studies indicate that infrared spectroscopy is a promising tool for estimating $\delta^{13}\text{C}$ in soil and provides an opportunity to increase the number of samples analyzed, which is often required for studying carbon dynamics in soil (Accoe et al., 2003).

NIRS generates complex absorption patterns that need to be processed mathematically to correlate latent variables with soil properties (Stenberg et al., 2010). Such analyses of soil spectra require the use of multivariate calibrations (Martens and Naes, 1989) to capture the information that is relevant to the calibration and validation of predictive models. The literature regarding the multivariate analysis of NIRS data has increased dramatically recently, and good results have been obtained for multiple soil properties (Theo, 2005; Viscarra Rossel et al., 2006; Viscarra Rossel and McBratney, 1998). NIRS is a more accessible tool for analysis and a suitable alternative to conventional chemical methods of soil analysis (Fuentes et al., 2012).

We report the development and validation of a predictive model to estimate the $\delta^{13}\text{C}$ value in soil. In contrast to other studies, this model ascribes the changes in the signals to a wide variety of soil types and profiles under different climatic conditions. Implementing this alternative methodology using NIRS to assess stable isotopes of carbon in soil is presented as a viable and low-cost technique for studying soil carbon dynamics in wide transects and at different depths, factors that increase the complexity and cost of the analysis.

2. Materials and methods

2.1. Soil Sampling

From the Chilean Coquimbo Region to Magallanes Region (30°–50° S), a total of eleven sites were carefully chosen to represent the soil transect. For the selection criteria used, see Doetterl et al. (2015). Briefly, these criteria included soils with a broad pH range (4.6–7.5) and a null HCl reaction; soils having a variety of moisture regimes (aridic, ustic, xeric, udic, and perudic), soil temperature regimes (thermic, isothermic, mesic, isomesic, and cryic), clay mineralogy (amorphous and crystalline); soils having different parent materials (volcanic ash, alluvial, fluvio-glacial material, marine sediment, among others); soils located within different climatic zones (arid-semiarid, Mediterranean arid, Mediterranean humid, humid, and Magallanian); and soils in natural prairie vegetation conditions (C3-type vegetation). Field sampling campaigns were conducted primarily during summer (2017–2018) and sampling units were defined in plots of 50 × 50 m, from which six random soil cores were extracted. These campaigns were an extension of the transect reported in Doetterl et al. (2015) and included additional depths of soil layers. Some of the new sites used in this study are listed in Tables 1 and 2.

2.2. Sample preparation

Soil samples were collected in triplicates to a depth of 60 cm or less (until gravel material was encountered) using polyvinylchloride (PVC) tubes (height: 35 cm; diameter: 90 mm) to extract undisturbed soil samples. Samples were then transported to the University of Concepción, where they were stored in at –20 °C until further processing. Soil sample profiles were obtained at intervals of 2 cm to 10 cm depth, at intervals of 5 cm between 10 and 30 cm depth; and at intervals of 10 cm between 30 and 60 cm depth. To obtain detailed soil layer data, tubes were cut using a custom-designed device that actioned a steel saw unit at high speed. Care and rigorous attention were given to avoid contaminating the soil with PVC powder or other materials. Samples were air-dried and sieved at 2 mm, and the fine roots were removed using electrostatic energy, as described by Kuzyakov et al. (2001).

2.3. Laboratory analysis

Samples were air-dried and scanned at NIR wavelengths (3500–12500 cm^{-1}) by diffuse reflectance. The resolution was 4 cm^{-1} , and the Fourier transform NIR (FT-NIR) system was a Bruker Matrix-I (Bruker Optics, Rheinstetten, Germany) located at the Soil and Environmental Laboratory of the Department of Soil and Natural Resources, Faculty of Agronomy, Universidad de Concepción. Soil samples were also analyzed for carbon isotopes with an elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometer (EA-IRMS) (ANCA-SL, Sercon, Crewe, UK), coupled to a 2020 IRMS (Sercon, Crewe, UK), at the Isotope Bioscience Laboratory (ISOFYS, www.isofys.be) of Ghent University, Belgium. The carbon isotopic ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of the soil samples is expressed relative to an international reference, using the delta notation ($\delta^{13}\text{C}$). The delta value expresses the fractional difference in isotopic ratio between the sample and an international reference. For ^{13}C , the international reference standard used is Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) and is typically expressed in parts per thousand (‰) (Chen et al., 2005).

2.4. Data treatment, model generation, and predictive model validation of $\delta^{13}\text{C}$

All data were pre-treated, and partial least-squares (PLS) regression was performed using Pirouette software (Infometrix, Bothell, WA, USA). PLS is a standard tool in multivariate analysis (Martens and Naes, 1989). Pre-treatment of spectroscopy data is performed to eliminate nonlinearities produced by light scattering; for NIRS of soil, these include variability in the light scattering due to soil roughness, aggregates, structure, and particle size. Raw NIRS data were treated by smoothing (Savitzky-Golay filter, 11 points), multiplicative scatter correction (MSC), normalization, and mean centering. MSC is the most widely used preprocessing technique for NIRS data, and artifacts or imperfections (e.g., undesirable scatter effects) are removed from the data matrix prior to data modeling (Rinnan et al., 2009). From the total data set (332 samples), six samples were identified as outliers using a leverages \times studentized residuals plot, available in the software and eliminated from the set. Of the remaining samples, 281 were used as the training set for PLS calibration, and 45 samples were used as the external validation set. Samples used as the external validation set did not participate in the construction of the PLS model and were chosen randomly from samples with high, medium, and low $\delta^{13}\text{C}$ values to test the performance of the model along the complete range of $\delta^{13}\text{C}$ values (Figure 1). The PLS model was calibrated using the $\delta^{13}\text{C}$ values obtained from EA-IRMS measurements. Leave-one-out cross-validation was performed on the PLS model as an internal validation that approximates the results that are likely to be obtained from external validation. This method removes one sample from the training set, performs a PLS regression on the remaining samples, predicts the “octane value” for the left-out sample, and then tallies the error. The

minimum number of latent variables were selected based on the decrease of root mean square error of cross-validation (RMSECV) using the leave-one-out method (Figure 2). Furthermore, Pirouette attempts to estimate the proper number of principal components using an F-test to evaluate the predictive power of the model. Finally, ten additional soil series from the transect were predicted by the model and used to estimate $\delta^{13}\text{C}$ values.

3. Results

3.1. Sites and soil selected characteristics.

Table 1 describes soil-relevant characteristics of the eleven selected sites. The data are georeferenced and illustrate the range of thermic and moisture soil regimes, geomorphology, and pedogenesis of the selected sites.

In a second stage, chemical characterization was also considered (Table 2) to ensure that the most varied content of selected parameters were assigned to the calibration set to establish a general model for other samples in the transect. Generally, nitrogen content decreases with depth, and large differences between locations are observed; however, in absolute terms, the lowest nitrogen values in topsoil (0–10 cm depth) are in soil series from the northern portion of the transect (soil series: Calle Larga, Pimpinela, and Bramaderos) and at 10–60 cm depth. The highest values are found in the extreme southern portion of the transect (soil series: Puerto Cisnes, Bahía Exploradores, Aguas Frescas, and Santa Olga). Typically, carbon content decreases with depth, and the lowest values in topsoil are found in soil series from the northern portion of the transect; the highest values are found in soil series from the extreme southern portion of the transect. At depths of 10–60 cm, the highest carbon values were found in the soil series from Puerto Cisnes. Chemical results were consistent with physical results; the highest bulk density in all three layers was found in the soil series from Bahía Exploradores, followed by soil series from the northern portion of the transect (soil series: Calle larga, Pimpinela, and Bramaderos). Clay content also varies along the transect. These chemical and physical parameters were important to establish which soil series should be selected for calibration to encompass the most varied soil conditions. Once the chemical analysis of these samples was carried out, we had data from a total of 332 samples with which to calibrate and validate the PLS model.

3.2. NIRS as a predictive tool

The ^{13}C data obtained from the 332 samples using EA-IRMS as a reference technique to construct the calibration model with NIRS as the predictive tool. $\delta^{13}\text{C}$ values ranged from -31‰ to -21.5‰ . The

spectra taken of samples from all depths were used in the construction of the model; however, the data from 281 samples were used for the construction of the model. Six samples were eliminated as described in the Materials and Methods section, and 45 samples were randomly selected for the external validation of the model. The six eliminated samples were all soil series from Choshuenco, primarily at 10–30 cm depth.

The results of our best calibrations are shown in Figure 2. The same process of transformation, preprocessing, and processing of the spectral data was conducted on each calibration; the difference between them is the number of latent variables that were used in the model. We selected a minimum number of latent variables based on decreases in the RMSECV and F-test. According to the estimate generated by Pirouette for the F-test, the optimal number of latent variables, or principal components, is 6. Using the RMSECV, there is no significant difference between 6, 7, or 8 principal components; however, in models of 9 or 10 components, the RMSECV decreases relative to the 6-latent-variable model, but there is no statistically significant difference between them. There is a small difference in RMSECV between the 6- and 9-latent-variable models; therefore, based on the decrease in RMSECV, we selected the 9-latent-variable model because of its prediction performance and suitability to estimate $\delta^{13}\text{C}$ values for soil samples within the entire transect.

The calibration statistical descriptors for the NIRS determination of $\delta^{13}\text{C}$ and the cross-validation runs for the calibration are shown in Table 3. Parameters such as root mean square error prediction (RMSEP) and R^2 , which describe the quality of the external validation for each model are shown in Table 3. The differences between the two models are minimal. The RMSEP in each model is good, but that of the 9-latent-variable model was slightly lower. These results also show that R^2 is greater than 0.65 for the validation for 6- and 9-latent-variable models.

In Tables 4 to 6, the results from ten other additional soil series are described. Descriptive characteristics of the sites are shown in Table 5, and the chemical and physical characteristics of the soil samples are described in Table 6. Nitrogen content decreases with depth in these soil series, ranging from 0.7 to 7 g $\text{N}\cdot\text{kg}^{-1}$ soil. The highest values are found in samples taken from soil series the extreme southern portion of the transect. Carbon also decreases in depth. Differences are seen in the carbon content between soil series from the northern and extreme southern portions of the transect, with soil series from the extreme southern portion having the highest carbon content. Finally, the predicted mean \pm SD values of $\delta^{13}\text{C}$ are shown in Table 4. $\delta^{13}\text{C}$ values ranged from -28.19‰ ($\pm 0.44\text{‰}$) to -20.84‰ ($\pm 0.99\text{‰}$).

4. Discussion

Improving our knowledge of soil carbon dynamics is essential for understanding the roles of soil carbon in the carbon cycle and feedback mechanisms in climate change. Measuring soil carbon dynamics requires accurate and low-cost soil analysis techniques because the number of samples needed in such studies is large. Our study included different soil types and profiles that were established under different environmental conditions to calibrate a predictive model to estimate $\delta^{13}\text{C}$ using NIRS.

NIRS is a cost-effective method to assess the $\delta^{13}\text{C}$ of SOC. The PLS approach to data reduction delivered good results when used for the processing of NIRS soil data; it reduced variability caused by unrelated parameters, such as soil roughness, aggregates, structure, and particle size (Reyna et al., 2017). The PLS approach is a standard tool in chemometrics (Wold et al. 2001); and it is also a common regression model used to predict $\delta^{13}\text{C}$ (Martens and Naes, 1989).

NIRS calibration data for ^{13}C EA-IRMS, as presented in Tables 3 and 4, show that it is possible to establish a suitable predictive model. Our primary concern was to select the correct number of latent variables; if too few components are chosen, then the model will not have adequate information to make reliable predictions. Conversely, if too many components are chosen, then the model will have noise as well as information, which will result in less reliable predictions. Edaphoclimatic conditions in Chile are extremely variable, which makes the issue of reliability important for developing a model to use with this type of transect. Therefore, the model having more components was selected, and we proposed a predictive model of nine latent variables. We evaluated the two candidate models based on the validation set performance, and the quality of the $\delta^{13}\text{C}$ values predicted using NIRS data as follows: 1) RMSEP values were 1.41‰ and 1.16‰ for the six- and nine-latent-variable models respectively. RMSEP is a helpful measure of accuracy because it reflects the average differences between measured and predicted values. Winowiecki et al. (2017) conducted a study and obtained similar results (RMSEP = 1.95 and $R^2 = 0.80$ using PLS regression) for $\delta^{13}\text{C}$ predictions in soil samples that differed primarily by vegetation class. 2) R^2 values for the six- and nine-latent-variable models were 0.67 and 0.79, respectively (Table 3). Our results are not only similar to those reported by Winowiecki et al. (2017) but also to those reported by Fuentes et al. (2012). Among the three studies, the samples represented a wide range of conditions, such as vegetation classes, crop residues and rotations, and edaphoclimatic. The good results obtained in these studies favor the use of NIRS as a predictive tool, providing stable and rapid readings of ^{13}C in SOC. Zornoza et al. (2008) suggests there is a high demand for rapid and predictive soil data in environmental monitoring, soil quality assessment, and emerging new methods of soil analysis. In their study, they

correlate soil fertility, physical, and biological properties using NIRS. In our case, we first established good predictions for the two selected models and then, based on the R^2 performance, the nine-latent-variable model was chosen. Because our spectral data covered a wide variety of soil profiles, a general technique capable of estimating $\delta^{13}\text{C}$ values for the entire transect was needed. In this regard, we find that the NIRS technique is very stable, and the predicted values between replicates have less SD than the reference technique, which is likely due to the relatively large size of the samples assayed with NIRS, minimizing problems with inhomogeneity.

Although the initial results were based on information from 11 sites, further estimates of $\delta^{13}\text{C}$ values were obtained from 10 additional sites in the transect to assess the prediction power of the methodology and the quality of the data obtained. The $\delta^{13}\text{C}$ values predicted using the nine-latent-variable model for the ten additional soil profiles given in Table 5 are examples of the prediction capacity of the selected model; and project its use for studying carbon dynamics in soil (Accoe et al. (2003) in a wide variety of soil profiles (work in progress).

5. Conclusion

A prediction model for $\delta^{13}\text{C}$ values based on NIRS data was established using a PLS regression model with nine latent variables and was grounded on parameters such as the R^2 for the validation set (0.79) and a root mean square error prediction of 1.16%. These parameters of the model performance indicate that NIRS can be used to predict $\delta^{13}\text{C}$ for a wide variety of soil profiles. The stable and rapid readings of ^{13}C of SOC obtained in this study support the use of NIRS as a predictive tool in soil analysis and as a nondestructive and waste-free methodology for the study of carbon dynamics in soil.

Acknowledgments

This research was supported by the government of Chile through Regular Fondecyt Project N° 1161492. We also acknowledge the Laboratory of Chemical Analysis of Soils and Plants of the University of Concepción for its support in the chemical characterization of soils.

References

- Accoe, F., Boeckx, P., Cleemput, O. V., Hofman, G. 2003. Relationship between soil organic C degradability and the evolution of the $\delta^{13}\text{C}$ signature in profiles under permanent grassland. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(23): 2591-2596.
- Balesdent, J., Mariotti, A. 1996. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. P. 83-111. In Boutton, T.W., Yamasaki, S, Eds., *Mass Spectrometry of Soils*, Marcel Dekker, New York, USA.
- Bricklemeyer, R. S., Miller, P. R., Paustian, K., Keck, T., Nielsen, G. A., Antle, J. M. 2005. Soil organic carbon variability and sampling optimization in Montana dryland wheat fields. *Journal of Soil Water Conservation* 60: 42–51.
- Carvalhais, N., Forkel, M., Khomik, M., Bellarby, J., Jung, M., Migliavacca, M., Reichstein, M. 2014. Global covariation of carbon turnover times with climate in terrestrial ecosystems. *Nature*, 514: 213-217.
- Chabbi, A., Kögel-Knabner, I., Rumpel, C. 2009. Stabilised carbon in subsoil horizons is located in spatially distinct parts of the soil profile. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 256–261.
- Chen, Q., Shen, C., Sun, Y., Peng, S., Yi, W., Li, Z. A., Jiang, M. 2005. Spatial and temporal distribution of carbon isotopes in soil organic matter at the Dinghushan Biosphere Reserve, South China. *Plant and Soil* 273(1-2): 115-128.
- Crowther, K. E., Todd-Brown, O., W. Rowe, C., Wieder, W. R., Carey, J. C., Machmuller, M. B., Snoek, B. L, Fang, S., Zhou, G., Allison, S. D., Blair, J. M., Bridgham, S. D., Burton, A. J., Carrillo, Y., Reich, P. B., Clark, J. S., Classen, A. T., Dijkstra, F. A., Elberling, B., Emmett, B. A., Estiarte, M., Frey, S. D., Guo, J., Harte, J., Jiang, L., Johnson, B. R., Kröel-Dulay, G., Larsen, K. S., Laudon, H., Lavallee, J. M., Luo, Y., Lupascu, M., Ma, L. N., Marhan, S., Michelsen, A., Mohan, J., Niu, S., Pendall, E., Peñuelas, J., Pfeifer-Meister, L., Poll, C., Reinsch, S., Reynolds, L. L, K. Schmidt, I., Sistla, S., Sokol, N. W., Templer, P. H., Treseder, K. K., Welker, J. M., Bradford, M. A.. 2016. Quantifying global soil carbon losses in response to warming. *Nature Letter Research* 540: 104-108

- Doetterl, S., Berhe, A. A., Arnold, C., Bodé, S., Fiener, P., Finke, P., Fuchslueger, L., Griepentrog, M., W. Harden, J., Nadeu, E., Schnecker, J., Six, J., Trumbore, S., Van Oost, K., Vogel, C., Boeckx, P. 2018. Links among warming, carbon and microbial dynamics mediated by soil mineral weathering. *Nature Geoscience* 11: 589–593.
- Doetterl, S., Stevens, A., Six, J, Merckx, R., Van Oost, K., Casanova Pinto, M., Casanova-Katny, A., Muñoz, C., Boudin, M., Zagal Venegas, E. Boeckx, P. 2015. Soil carbon storage controlled by interactions between geochemistry and climate. *Nature Geoscience* 8: 780-783.
- Finke, P., Opolot, E., Balesdent, J., Berhe, A. A., Boeckx, P., Cornu, S., Harden, J., Hatté, C., Williams, E., Doetterl, S. 2019. Can SOC modeling be improved by accounting for pedogenesis?. *Geoderma* 338: 513-524.
- Fontaine, S., Barot, S., Barre, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C. 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450: 277–281.
- Fuentes, M., Hidalgo, C., González-Martín, I., Hernández-Hierro, J. M., Govaerts, B., Sayre, K. D., Etchevers, J. 2012. NIR spectroscopy: An alternative for soil analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43(1-2): 346-356.
- Glaser, B. 2005. Compound-specific stable-isotope ($\delta^{13}\text{C}$) analysis in soil science. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168(5): 633-648.
- Kuzyakov, Y., Biriukova, O., Turyabahika, F., Stahr, K. 2001. Electrostatic method to separate roots from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 164: 541-545.
- Lal, R. 2006. Soil carbon sequestration in Latin America. pp. 49-64. In: Lal, R. et al. (eds.) *Carbon sequestration in soils of Latin America*. The Haworth Press, Binghamton, New York, USA.
- Martens, H., Naes, T. 1989. *Multivariate calibration*. JohnWiley & Sons, Chichester, UK.
- Mooney, S., Antle, J., Capalbo, S., Paustian, K. 2004. Influence of project scale and carbon variability on the costs of measuring soil carbon credits. *Environmental Management* 33: S252–S263.

- Petisco, C., García-Criado, B., Mediavilla, S., Vázquez De Aldana, B. R., Zabalgoceazcoa, I., García-Ciudad, A. 2006. Near-infrared reflectance spectroscopy as a fast and non-destructive tool to predict foliar organic constituents of several woody species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386 (6): 1823-1833.
- Reyna, L., Dubé, F., Barrera, J.A., Zagal, E. 2017. Potential Model Overfitting in Predicting Soil Carbon Content by Visible and Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Science* 7: 708.
- Rinnan, A., Van den Berg, F., Engelsen, B. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (10): 1201–1222.
- Rumpel, C., Kögel-Knabner, I., Bruhn, F. 2002. Vertical distribution, age, and chemical composition of organic carbon in two forest soils of different pedogenesis. *Organic Geochemistry* 33: 1131–1142.
- Stenberg, B., Viscarra Rossel, R. A., Mouazen, A. M., Wetterlind, J. 2010. Visible and Near Infrared Spectroscopy in Soil Science. *Advances in Agronomy* 107: 163:215.
- Trumbore, S. 2009. Radiocarbon and Soil Carbon Dynamics. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 37 (1): 47-66.
- Viscarra Rossel, R. A., Walvoort, D., McBratney, A. B., Janik, L. J., Skjemstad, J. O. 2006. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma* 131(1-2): 59-75
- Viscarra Rossel, R.A., McBratney, A.B. 1998. Laboratory evaluation of a proximal sensing technique for simultaneous measurement of clay and water content. *Geoderma* 85 (1), 19– 39.
- Winowiecki, L. A., Vågen, T., Boeckx, P., Dungait, J. 2017. Landscape-scale assessments of stable carbon isotopes in soil under diverse vegetation classes in East Africa: application of near-infrared spectroscopy. *Plant and Soil* 421(1-2): 259-272.
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58:109–130.

Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K.M., Arcenegui, V., Mataix-Beneyto, J. 2008. Near Infrared spectroscopy for determination of various physical, chemical, and biochemical properties in Mediterranean soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1923-1930.



Figure Legends

Figure 1. Flowchart of the model construction process.

Figure 2. Measured versus predicted $\delta^{13}\text{C}$ values for six and nine latent variables

Figure 3. Latent variables and the associated root mean square error of cross validation (RMSECV) values.

Tables

Table 1. Description of the eleven sites used for the calibration and validation of the predictive model

Table 2. Chemical and physical properties of the eleven sites used for model construction

Table 3. Calibration and external validation performance values for selected models

Table 4. Prediction of soil ^{13}C estimates at ten additional sites

Table 5. Description of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model

Table 6. Chemical and physical properties of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model



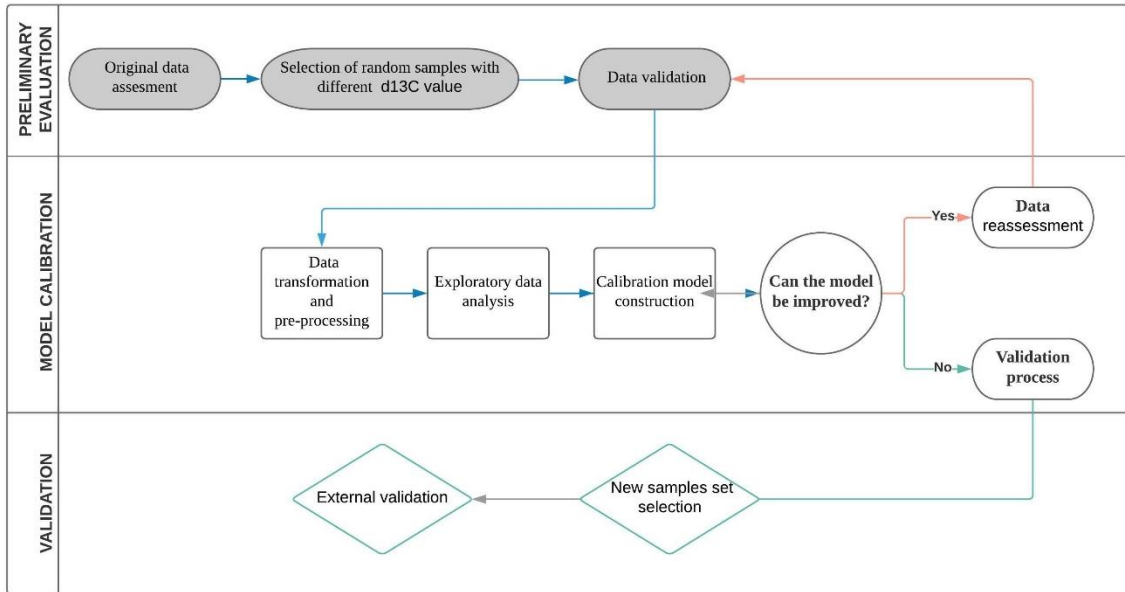


Figure 1. Flowchart of the model construction process (source: own elaboration).



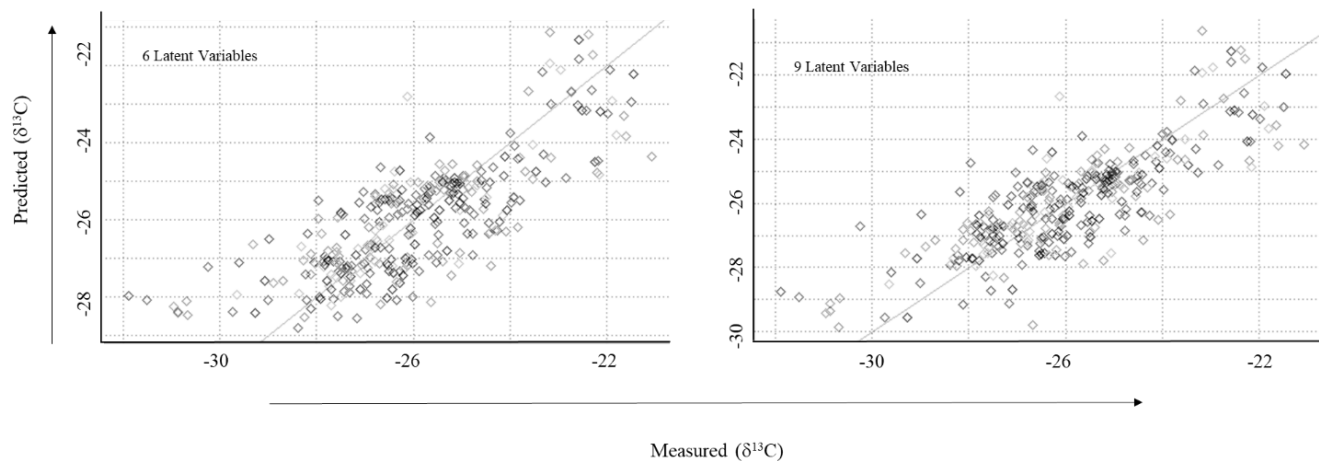


Figure 2. Measured versus predicted $\delta^{13}\text{C}$ values for six and nine latent variables (source: own elaboration).



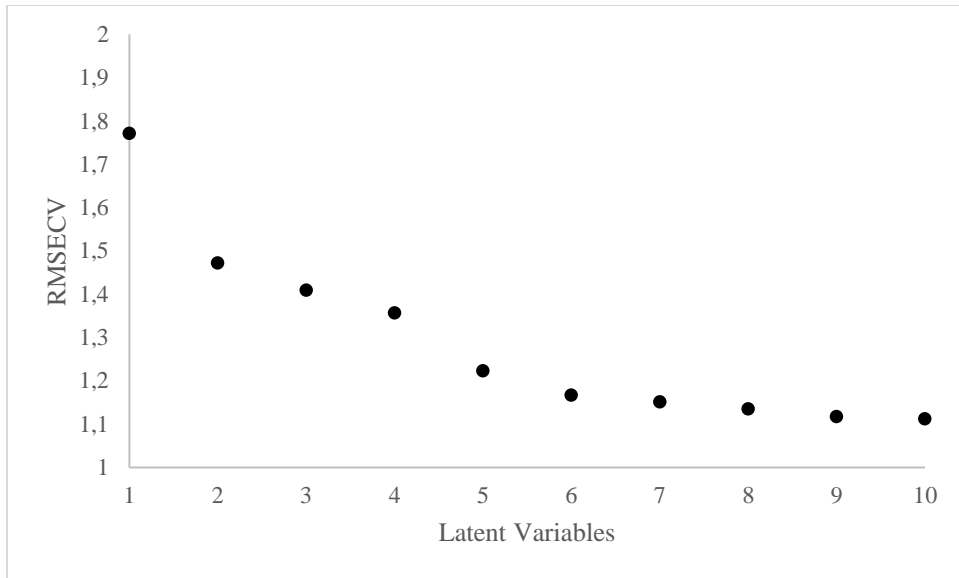


Figure 3. Latent variables and the associated root mean square error of cross validation (RMSECV) values. (source: own elaboration).



Soil Series	WGS1984		STR	SMR	Soil Suborder (Soil Taxonomy)	Geomorphology
	X (ddd,ddd)	Y (ddd,ddd)				
Calle Larga	-70.52162	-32.87609	Thermic	Xeric	Typic Argixeroll	Piedmont
Pimpinela	-70.72972	-34.32387	Thermic	Xeric	Mollic Haploxeralf	Piedmont
Bramaderos	-71.31464	-35.61330	Thermic	Xeric	Humic Haploxerand	High alluvial terraces
Santa Bárbara	-71.69721	-36.45816	Thermic	Xeric	Typic Haploxerand	Old fluvioglacial terraces
Choshuenco	-72.11120	-39.85941	Isomesic	Udic	Andic Dystrudept	Hillocks and hills
Mayamó	-73.79915	-42.05300	Isomesic	Perudic	Acrudoxic Durudand	Gentle rolling hills
Aituí	-73.61712	-43.05791	Isomesic	Perudic	Hydric Fulvudand	High planes
Puerto Cisnes	-72.61337	-45.38105	Isomesic	Perudic	Acrudoxic Fulvudand	Fluvio-glacial terrace
Bahía Exploradores	-73.06868	-46.50487	Mesic	Udic	Oxyaquic Hapludand	Hills
Aguas Frescas	-70.98860	-53.43267	Cryic	Udic	Inceptisol	Marine terraces
Santa Olga	-70.36106	-53.31478	Isomesic	Perudic	Inceptisol	Marine terraces

X and Y: coordinates; STR: soil thermic regime; SMR: soil moisture regime.

Table 1. Description of the eleven sites used for the calibration and validation of the predictive model (source: own elaboration).

Soil Series	Nitrogen (g N·kg ⁻¹ soil)			Carbon (g C·kg ⁻¹ soil)			Bulk density (g·cm ⁻³)			Clay (%)	
	Depth (cm)	0–10	10–30	30–60	0–10	10–30	30–60	0–10	10–30	30–60	0–10
Calle Larga		5.77	2.30	Ns	52.24	20.89	ns	1.4	1.8	Ns	32.3
Pimpinela		2.02	1.57	Ns	20.08	14.59	ns	0.9	1.1	Ns	36.0
Bramaderos		4.72	5.07	4.39	54.48	59.76	55.42	1.4	1.5	0.9	20.7
Santa Bárbara		5.13	3.33	2.14	62.42	40.57	23.79	0.8	0.7	0.6	29.5
Choshuenco		9.28	4.29	3.91	108.00	43.26	47.11	0.7	0.5	0.8	15.6
Mayamó		10.96	6.43	4.61	138.55	91.88	59.44	0.7	0.6	0.8	8.4
Aituí		13.67	7.53	5.38	171.94	105.21	71.06	0.6	0.4	0.5	16.8
Puerto Cisnes		16.06	10.37	6.62	163.93	126.52	82.79	0.5	0.6	0.3	17.5
Bahía Exploradores		4.93	1.04	1.00	60.74	15.83	14.48	1.7	1.7	1.0	24.3
Aguas Frescas		4.54	0.50	Ns	67.66	13.26	ns	0.7	0.7	Ns	7.6
Santa Olga		7.65	4.77	Ns	150.23	91.86	ns	0.6	0.8	Ns	13.0

ns: not sampled due to an excessive amount of gravel

Table 2. Chemical and physical properties of the eleven sites used for model construction (source: own elaboration).

Latent Variables	N	Variance (%)	RMSEV	r Val	RMSEC	r Cal	RMSEP	R ²
6	281	99.55	1.17	0.78	1.14	0.80	1.41	0.67
9	281	99.79	1.12	0.80	1.04	0.84	1.16	0.79

n: sample size; RMSEV: root mean square error of cross validation; r Val: validation correlation; RMSEC: root mean square error calibration; r Cal: calibration correlation

Table 3. Calibration and external validation performance values for selected models (source: own elaboration).



Mean \pm SD values of $\delta^{13}\text{C}$ for the predictive model using nine latent variables																				
Depth (cm)	Catapilco		Bochinche		Peule		Collipulli		Bahía Mansa		Corte Alto		La Tapera		Simpson		Murta		Cochrane	
	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm	\bar{X}	\pm
0–2	-23.89	0.29	-25.90	0.12	-25.74	0.16	-23.34	0.45	-28.19	0.44	-26.67	0.13	-26.71	0.10	-25.98	0.23	-28.04	0.69	-27.89	0.01
2–4	-23.78	0.20	-25.59	0.18	-25.64	0.13	-22.91	0.50	-27.86	0.16	-26.57	0.13	-26.83	0.19	-26.07	0.29	-27.61	0.28	-27.88	0.68
4–6	-23.85	0.22	-25.27	0.21	-25.67	0.03	-22.85	0.45	-27.77	0.04	-26.67	0.18	-26.30	0.37	-26.07	0.36	-27.40	0.24	-27.57	0.59
6–8	-23.68	0.08	-24.98	0.15	-25.67	0.06	-22.84	0.12	-27.83	0.23	-26.53	0.05	-26.25	0.29	-26.12	0.06	-27.19	0.22	-27.48	0.38
8–10	-23.43	0.14	-25.09	0.13	-25.66	0.16	-22.76	0.26	-27.78	0.26	-26.47	0.25	-26.26	0.26	-26.29	0.18	-27.05	0.14	-27.24	0.16
10–15	-23.31	0.17	-24.74	0.06	-25.48	0.11	-22.17	0.69	-27.79	0.36	-26.04	0.27	-25.84	0.22	-26.09	0.23	-26.86	0.54	-26.67	0.23
15–20	-23.14	0.20	-24.70	0.04	-25.34	0.15	-21.17	1.75	-27.77	0.26	-26.08	0.18	-26.13	0.33	-26.20	0.35	-26.72	0.27	-26.43	0.30
20–25	-23.11	0.18	-24.81	0.14	-25.41	0.25	-20.84	1.40	-27.78	0.80	-26.23	0.11	-25.97	0.26	-26.09	0.14	-26.56	0.37	-26.16	0.10
25–30	-23.04	0.21	-25.63	0.72	-25.53	0.07	-20.89	0.99	-27.58	0.54	-25.88	0.17	-25.66	0.20	-25.82	0.10	-26.53	1.21	-26.14	0.06
30–40	ns	ns	Ns	ns	-26,00	0,47	Ns	ns	-27.92	0.88	-25.41	0.24	-25.46	0.29	-25.67	0.07	ns	ns	ns	ns
40–50	ns	ns	Ns	ns	-25,86	0,15	Ns	ns	-28.07	1.30	-24.81	0.04	-25.46	0.19	-25.41	0.10	ns	ns	ns	ns
50–60	ns	ns	Ns	ns	-26,09	0,28	Ns	ns	-28.54	0.41	-24.60	0.63	-25.50	0.14	-25.21	0.06	ns	ns	ns	ns

\bar{X} : Average predicted $\delta^{13}\text{C}$ value; \pm : standard deviation; ns: not sampled due to an excessive amount of gravel

Table 4. Prediction of soil ^{13}C estimates at ten additional sites (source: own elaboration)

Soil Series	WGS1984		STR	SMR	Soil Suborder (Soil Taxonomy)	Geomorphology
	X (ddd,ddd)	Y (ddd,ddd)				
Catopilco	-73.38968	-38.77412	isothermic	Ustic	Udolic Albaqualf	Marine terraces
Bochinche	-71.61243	-33.33901	isothermic	Ustic	Typic Haploxeroll	Marine terraces
Peule	-73.38968	-38.77412	Isomesic	Udic	Typic Endoaquept	Alluvial terraces
Collipulli	-71.69726	-36.45817	Mesic	Udic	Typic Rhodoxealf	High remaining hillsides
Bahía Mansa	-73.74889	-40.60894	Isomesic	Udic	Oxic Dystrudept	Marine terraces
Corte Alto	-73.15504	-40.90340	iscomesic	Udic	Typic Hapludand	Remaining terraces
La Tapera	-71.78442	-44.65847	mesic	Udic	Typic Hapludand	Gentle rolling hills
Simpsons	-71.93055	-45.81293	mesic	Udic	Andic Dystrudept	Old alluvial terraces
Murta	-72.61276	-46.56823	mesic	Udic	Typic Hapludand	Hillocks and hills
Cochrane	-72.64559	-47.32349	mesic	Udic	Andic Oxyaquic Dystrudept	Rolling hills

X and Y: coordinates; STR: soil thermic regime; SMR: soil moisture regime

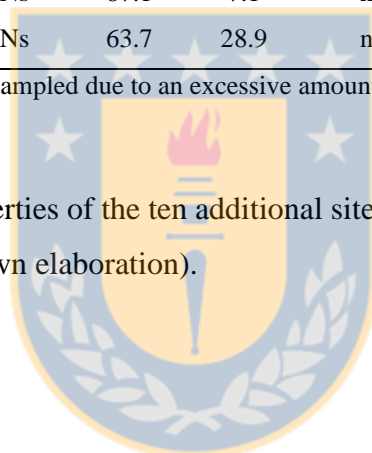
Table 5. Description of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model (source: own elaboration).



Soil Series	Nitrogen (g N·kg ⁻¹ soil)			Carbon (g C·kg ⁻¹ soil)			Bulk density (g·cm ⁻³)			Clay (%)
	0–10	10–30	30–60	0–10	10–30	30–60	0–10	10–30	30–60	0–10
Catapilco	0.7	1.4	Ns	24.4	19.5	ns	1.7	1.6	ns	17.3
Bochinche	1.2	1.9	Ns	22.0	22.0	ns	1.7	1.9	ns	8.4
Peule	4.3	0.9	1.0	43.9	9.7	17.5	1.0	1.1	1.2	17.6
Collipulli	1.2	0.2	Ns	35.5	17.7	ns	1.6	1.4	ns	37.8
Bahía Mansa	4.6	1.4	1.0	64.4	30.2	16.4	1.1	1.2	1.4	39.8
Corte Alto	6.9	1.7	1.5	77.3	39.4	32.9	0.7	0.8	0.9	26.6
La Tapera	5.7	1.4	1.1	72.1	31.8	20.3	0.9	0.9	0.9	11.8
Simpsons	4.8	1.8	1.5	58.3	35.0	27.9	0.6	0.8	1.7	7.6
Murta	5.6	0.7	Ns	87.1	7.1	ns	0.7	0.7	ns	8.4
Cochrane	3.2	1.2	Ns	63.7	28.9	ns	0.6	0.9	ns	10.1

ns: not sampled due to an excessive amount of gravel

Table 6. Chemical and physical properties of the ten additional sites that were not used for the calibration or validation of the model (source: own elaboration).



CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

El estudio en torno al C del suelo y sus distintos reservorios (ej. lábil v/s recalcitrante) se ha venido investigando durante mucho tiempo. Sin embargo, el cambio climático ha generado incertidumbre en la dinámica del C y, consecuentemente, de la influencia de cambios en la temperatura y precipitaciones en la dinámica de estos reservorios. Existe actualmente la necesidad de reevaluar lo que se conoce hasta ahora, debido a la controversia en la comunidad científica internacional respecto de la sensibilidad de estos reservorios al cambio climático.

Cuantificar la dinámica del C, del suelo específicamente, adquiere importancia en los últimos años, dentro del contexto del cambio global, ya que los suelos juegan un papel importante en el intercambio de gases tierra-atmósfera. Aún con los datos obtenidos a partir de las investigaciones, el conocimiento sigue limitado por la ausencia de datos homogéneos que permitan generar modelos a través de escalas temporales y espaciales. Esto se debe principalmente a la diversidad de metodologías existentes para la cuantificación de C, en sus distintas formas, de tal manera que se dificulta homologar la información para crear bases de datos, importantes para el establecimiento de modelos predictivos de comportamiento de la dinámica de C en los suelos del mundo.

Trabajar con nuevos instrumentos, ha entregado herramientas alternativas capaces de facilitar el trabajo científico que se ha venido realizando las últimas décadas e integrar los datos que se están obteniendo en diversas partes del globo para unificar los datos. El uso de NIRS como una de estas nuevas herramientas, permite, generar modelos predictivos a partir de distintas técnicas de referencia, a través de procedimiento sencillo que disminuyen el uso de sustancias tóxicas y que tienen la particularidad de no destruir las muestras analizadas; además de disminuir los costos y tiempos de procesamientos, lo que ha potenciado el uso de NIR como un instrumento alternativo a las técnicas convencionales.

El uso de la información contenida en los espectros, no se limita simplemente a la calibración basada en una técnica de referencia, sino que la información queda disponible para generar nuevas calibraciones/validaciones y nos permite construir librerías espectrales, multiplicando el uso que se le da a la información de los espectros, eliminando las limitaciones asociadas a la mayoría de las técnicas de características fisicoquímicas, hoy en día utilizadas.

Con este trabajo se ha logrado generar un modelo para la predicción de la abundancia natural de ^{13}C en muestras de suelos secas y tamizadas, disminuyendo los costos y tiempos de procesamiento, y se ha obtenido un total de más de 400 datos espectrales en un corto periodo de tiempo, lo que potencia a NIR como un instrumento ideal, que, con ayuda de análisis multivariado, tiene una buena capacidad predictiva. El análisis multivariado, es una herramienta estadística que considera múltiples variables de manera simultánea, lo que se traduce en que podremos obtener el contenido máximo de información química relevante, de los espectros con los que se trabajaron. En el marco del desarrollo de este trabajo de tesis, la aplicación de esta técnica contribuyó a identificar las variables cuya información es relevante, y conseguir su correlación con la técnica de referencia, en este caso IRMS, para el establecimiento del modelo de predicción.

Las principales limitaciones encontradas a la hora de establecer un modelo de predicción se encuentran en primer lugar, en las variadas herramientas (suavizado, derivadas, etc.) que se pueden utilizar durante el pre procesamiento de los datos espectrales, para lo cual no hay una fórmula definida y se necesita entrenamiento previo debido a que se evalúan los espectros de manera cualitativa. En segundo lugar, fue necesario el uso de Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (*del Inglés: Partial Least Squares, PLS*), herramienta estadística, cuyo objetivo dentro de este trabajo contribuye a homogenizar la variabilidad espectral producida, entre otros, por la estructura del suelo. A diferencia de otras matrices, el suelo tiene características como el tamaño de partícula, contenidos de agregados y cantidad de agua retenida cuyos efectos principalmente apuntan a generar diferencias en la reflectancia de la luz.

Un tercer obstáculo a la hora de la evaluación y validación del método, es el desarrollo de modelos robustos, que sólo se consiguen con un tamaño muestral grande. Este problema podría ser solucionado mediante el establecimiento de librerías espectrales, que será posible crear a medida que nuevas muestras, de diferentes sitios, se vayan incorporando a la información con la que se cuenta actualmente. Las librerías espectrales, se utilizan como una colección de información disponible para nuevos análisis. Así será posible, por ejemplo, utilizar técnicas multivariadas exploratorias, como la técnica análisis de componentes principales (ACP) que tiene por objeto transformar un conjunto de variables y ordenarlas de acuerdo con la información que llevan incorporada para establecer mecanismos de clasificación o agrupación entorno a la información de las muestras.

Analizando los resultados obtenidos, es importante considerar la variabilidad del suelo y de las condiciones por las cuales se puede ver afectado. Tanto las condiciones climáticas como las condiciones edafológicas tienen gran predominio dentro de una calibración a través de NIR, y se vuelven importantes

a la hora de seleccionar el objetivo con el que se desea elaborar un modelo predictivo. Se puede optar por generar modelos generales, que incorporen gran variabilidad en los datos, como se hizo en este caso. También se puede generar modelos específicos, con mayor capacidad predictiva, pero cuyo uso se limita generalmente a un tipo de suelo con características fisicoquímicas definidas.

Actualmente nuestros esfuerzos se encuentran en proyectar lo aprendido en este trabajo, en continuar generando calibraciones para otros parámetros de relevancia científica como por ejemplo la constante de la tasa de descomposición de C, biomasa microbiana e incluso marcadores de biomasa presentes en suelo. Esto gracias a que se puede contar con la información contenida en los espectros analizados hasta la fecha, para así, crear nuestra propia librería de datos espectrales de suelos chilenos.

Es posible plantearse como objetivo futuro, encontrar nuevos indicadores a través de los cuales se pueda calibrar los espectros, que faciliten la interpretación del estado de los suelos; mejorar el trabajo que se realiza hoy en análisis de rutina. Una alternativa, es utilizar estas herramientas para mejorar el trabajo que sea realiza hoy en día en análisis químicos y físicos de rutina como la determinación de materia orgánica, contenidos de N, C y densidad aparente que, aunque ya ha sido probada por otros investigadores, la aplicación de la espectroscopia infrarrojo cercano en la determinación de éstos, nos permitiría disminuir el uso de reactivos tóxicos y mejorar la eficiencia de laboratorios de servicios y/o investigación que usan actualmente técnicas convencionales, lo que además se traduciría en una disminución de los costos de análisis para los agricultores. Es por todo lo anterior que, a partir del año 2018, la Red Latinoamericana de Laboratorios de Suelo (LATSOLAN), a cargo de la Alianza Mundial por el Suelo (AMS), promotora del manejo sostenible del suelo, indica el uso de tecnologías como el NIR, como una herramienta para generar análisis no invasivos, económica y amigable con el ambiente, capaz de entregar diferentes análisis con sólo una determinación.