



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Agrarias
Licenciatura en Recursos Naturales

**“EL DISTURBIO DE LA AGRICULTURA: SU INCIDENCIA
SOBRE MICROORGANISMOS DEL SUELO”.**

Tesinista: Eva Ruth Kirilovsky

Directora: Ing. Agr. (MSc.) Silvia Irene Boccanelli

Co-directora: Ing. Agr. Marta Bortolato

Lugar de trabajo: Cátedras de Ecología y Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

Fecha: 4 de noviembre de 2016



ÍNDICE

DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
RESUMEN EN INGLÉS	5
PALABRAS CLAVE.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
El disturbio en los agroecosistemas	7
El enfoque microbiológico funcional.....	8
Propiedades físico-químicas del suelo	15
Efectos de la vegetación y el manejo	21
Indicadores de salud y calidad del suelo.....	25
Antecedentes	26
Hipótesis	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Descripción del área de estudio	29
Ubicación geográfica y características del suelo	29
Clima y condiciones meteorológicas	29
Muestreo	32
Análisis de laboratorio	34
Análisis estadístico de los datos.....	35
RESULTADOS	37
Análisis de laboratorio	37
Análisis estadístico de los datos.....	38
Análisis de la Varianza y Test de Tukey.....	38
Análisis multivariante de la varianza no-paramétrico basado en permutaciones	47
Análisis Canónico de Coordenadas Principales.....	48
Análisis de Correspondencia Canónica.....	49
Correlaciones.....	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXO I: CONDICIONES METEOROLÓGICAS	75

ANEXO II: FOTOGRAFÍAS	78
Tratamientos	78
Trabajo de laboratorio	81
ANEXO III: Medios de cultivo	87

DEDICATORIA

A mis compañeros de la carrera, especialmente a mis magníficas compañeras con las que cursamos juntas todos estos años, por los buenos momentos, los miedos, las pasiones y los mates compartidos.

A mis padres Stella y Héctor por impulsarme a estudiar una carrera, por dejarme elegir lo que me apasiona en la vida, por apoyarme todos estos años anímica y económicamente y principalmente por formarme en los valores para ser una profesional y una persona digna.

A mi marido Lucas por darme las fuerzas para seguir aplicándome día a día, por estudiar conmigo cada una de las materias, por calmarme en las crisis de pánico, por creer en mí y por ayudarme a proyectar ese futuro que nos espera.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Silvia Boccanelli, mi codirectora Marta Bortolato y nuestra asesora Silvia Toresani, por idear este proyecto y ayudarme a llevarlo adelante en cada paso.

A Patricia Torres por enseñarme a usar las herramientas estadísticas y guiarme en la realización de los análisis de los datos.

A María Eugenia Schiavon y Andrés Saperdi por ayudarme a hacer los análisis de suelo.

A la Cátedra de Climatología Agrícola por facilitarme los datos de la estación meteorológica y a la de Inglés por ayudarme con el resumen.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y su maravilloso equipo de docentes y no docentes por crear esta hermosa carrera, por dar todo de sí para garantizar una formación de excelencia, y por el espacio y los recursos que me brindaron tanto en la tesina como a lo largo de toda la carrera.

RESUMEN

En la Región Pampeana, los ecosistemas prístinos han sido perturbados durante más de cien años por los distintos manejos agronómicos. Esos cambios involucran a la comunidad microbiana del suelo, dado que alteran los regímenes de temperatura y humedad y el intercambio gaseoso en el perfil, influyendo en la mineralización de la materia orgánica y el ciclado de los nutrientes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sobre la microbiología del suelo de diferentes prácticas agronómicas (monocultivo de soja, rotación agrícola y rotación agrícola-ganadera) tomando como referencia una clausura de 32 años de antigüedad. Los parámetros microbiológicos evaluados fueron: densidad microbiana de celulolíticos (Cel), amonificantes (Amo), nitrificantes (Nit), fijadores de N₂ de vida libre (Azo), fijadores simbióticos de N₂ (Riz), microorganismos heterótrofos aerobios totales (HT) y actividad enzimática global (FDA). Para la caracterización físico-química de los suelos se evaluó contenido de materia orgánica (MO), pH y contenido de humedad (Hum). Para el análisis estadístico de los datos se aplicó ANOVA, MANOVA, Análisis discriminante canónico y Análisis de correspondencia canónica y se evaluó la correlación entre las variables. Cada variable tuvo un comportamiento diferente que respondió a distintos factores ambientales, relacionados o no con el grado de deterioro antropogénico. Azo, HT y MO caracterizaron a los ambientes de mayor sustentabilidad, la rotación agrícola-ganadera y la clausura. Además, fueron las variables que mejor se correlacionaron entre sí. El análisis conjunto de todas las variables permitió concluir asimismo que existe acidificación, incluso en la clausura y que la rotación no logra diferenciarse del monocultivo, principalmente por el manejo idóneo del mismo con presencia de cobertura invernal. Los resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene el manejo sobre la comunidad microbiana del suelo y, en consecuencia, sobre la recirculación de los nutrientes en los ecosistemas.

RESUMEN EN INGLÉS

In the Pampas region, in Argentina, pristine ecosystems have been disturbed for over a hundred years by the different agronomic management strategies. These changes affect the soil microbial community, for they alter temperature, moisture and gas exchange in the soil profile, thus affecting organic matter mineralization and nutrient cycling. The purpose of this research was to evaluate the effect of different farming practices (soybean monoculture, crop rotation and integrated cropping-livestock system) on the soil microbiology, taking a field under permanent enclosure for 32 years as a reference. The microbiological parameters considered were: global enzymatic activity (FDA) and population densities of cellulolytic microorganisms

(Cel), amonifiers (Amo), nitrifiers (Nit), free living (Azo) and symbiotic (Riz) nitrogen fixing bacteria and total heterotrophic aerobic microorganisms (HT). Organic matter content (MO), pH and moisture levels (Hum) were also evaluated to physically and chemically characterize the soil. Data were analyzed with ANOVA, MANOVA, Canonical discriminant analysis and Canonical correspondence analysis. Variable correlations were also evaluated. Each variable responded differently to diverse environmental factors, though these differences were not necessarily related to the degree of anthropogenic deterioration. Azo, HT and MO characterized the most sustainable environments, the integrated cropping-livestock system and the enclosed field. They were also the variables with the highest correlation coefficient. The analysis of all the variables combined showed that there was acidification, even in the enclosed field, and that crop rotation couldn't be differentiated from the monoculture, mainly because of the ideal management of the latter, with use of soil cover over the winter. These results show how important management is for the soil microbial community and, consequently, for ecosystem nutrient cycling.

PALABRAS CLAVE

Microbiología edáfica; Impacto agrícola; Rotaciones; Enfoque funcional; Indicadores edáficos.

INTRODUCCIÓN

El disturbio en los agroecosistemas:

El ecosistema se puede definir como el conjunto de seres vivos (vegetales, animales y microorganismos) y factores ambientales (climáticos y del sustrato) que se encuentran en un lugar y que directa o indirectamente interactúan entre sí. Constituye una unidad funcional que se autorregula y se encuentra en equilibrio dinámico (Lewis, 2001). Como consecuencia de esta dinámica, a lo largo del tiempo suelen sucederse cambios en la composición florística y/o en la importancia relativa de las especies de la comunidad vegetal, se modifica el suelo y cambian las comunidades de animales y de microorganismos (Lewis, 2001).

En la dinámica de los ecosistemas intervienen distintos tipos de disturbios. Grime (1979) define a los disturbios como fenómenos de variada naturaleza que provocan la destrucción total o parcial de la biomasa existente en un lugar determinado, excluyendo a la destrucción de la biomasa por senescencia (Grubb, 1985). La agricultura, el pastoreo, quema de pastizales, etc. son claros ejemplos de estos fenómenos.

En la Región Pampeana, las comunidades vegetales prístinas, estables y en equilibrio con el ambiente, llamadas comunidades climácicas, han sido perturbadas durante mucho tiempo por el gran disturbio que significa la agricultura, práctica que se viene desarrollando desde hace más de cien años en esta región. Además, el desplazamiento en las últimas décadas de la producción agropecuaria tradicional a raíz de una intensificación no sustentable de la agricultura (manejo indiscriminado del suelo y agricultura continua con predominio de monocultivo de soja o rotación trigo/soja) (Villar y Romero, 1999), en función de criterios económicos, ha acelerado la transformación del paisaje y causado el empobrecimiento de los suelos, con graves consecuencias paisajísticas y medioambientales (Sans, 2007).

Los distintos manejos agronómicos producen disturbios de diferente intensidad en el ecosistema. Según Sans (2007), ciertas prácticas agrícolas como ser la rotación, los policultivos, los cultivos de cobertura y el mantenimiento de vegetación en los márgenes de las áreas cultivadas, se asocian con un aumento de la biodiversidad, mientras que el monocultivo, la fertilización química y la aplicación de pesticidas y herbicidas conllevarían a una disminución de la biodiversidad.

Los cambios generados por los disturbios pueden ser profundos y a veces difíciles de apreciar cuando son paulatinos, ya que nos vamos acostumbrando lentamente a ellos. Una de las maneras de observar y ponderar estos efectos es comparando las diferencias que surgen a lo

largo del tiempo entre un lugar de referencia sin intervención del hombre y los lugares que están siendo alterados. A estos espacios de referencia se los cierra para evitar la intervención antrópica, por ello se los denomina “clausuras”. De esta manera, se convierten en refugios de las especies que a ellos acceden y constituyen una herramienta muy útil para estudiar la dinámica de los ecosistemas a través del tiempo (Boccanelli *et al.*, 2009).

En el año 1982 la cátedra de Ecología instaló una clausura de tres hectáreas en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario en la localidad de Zavalla, provincia de Santa Fe. Esta área se encuentra dentro de la provincia fitogeográfica Pampeana (Cabrera, 1951; 1976) cuya vegetación original característica era de praderas o pseudoestepas, siendo las comunidades vegetales más importantes en las áreas altas y bien drenadas, como es el área involucrada en este estudio, distintos tipos de flechillares caracterizados por la presencia de distintas especies del género *Nassella*, y siendo las especies más importantes: *Nassella neesiana* (Trin & Rupr.) Barkworth, *Nassella hyalina* (Nees) Barkworth, *Jarava plumosa* (Spreng.) S.W.L. Jacobs & J. Everett y *Bothriochloa laguroides* (DC) Herter. La historia previa del lote no se conoce exactamente, aunque coincidiría con la de otros campos de la zona, con una larga tradición de agricultura con predominio de maíz, trigo, antiguamente lino y, a partir de los setentas, soja en reemplazo del maíz. Luego de la creación del Campo Experimental en el año 1969, se llevaron a cabo ensayos de práticamente y herbicidas por un corto tiempo. Finalmente, previo a la instalación de la clausura y como parte del experimento que le dio origen, se dividió el lote en tres bloques, subdividiendo cada uno de ellos en cuatro parcelas donde se aplicaron al azar los tratamientos de arado y rastreado, siembra y cosecha de trigo, siembra y cosecha de soja y siembra de una pastura (Boccanelli, 2004). Al estudiar la dinámica de la vegetación luego del abandono de la agricultura, se comprobó que la vegetación prístina u original del pastizal pampeano no se recupera y se concluyó que la agricultura es un disturbio de gran magnitud, que ha superado el umbral de tolerancia de la comunidad vegetal prístina (Etchepare y Boccanelli, 2007; Boccanelli *et al.*, 2010; Boccanelli, 2011).

El enfoque microbiológico funcional:

Con posterioridad a un disturbio los cambios que se dan dentro de los componentes bióticos del ecosistema no sólo involucran a la fitocenosis (comunidad vegetal), sino también a la zoocenosis (comunidad animal) y a la comunidad microbiana del suelo (Lewis, 2001). Esto último se debe a que se alteran los regímenes de temperatura y humedad y el intercambio

gaseoso en el perfil del suelo, lo que influye en la mineralización de la materia orgánica y el ciclado de los nutrientes (De La Fuente y Suárez, 2008).

Los microorganismos constituyen un gran número de organismos primitivos y simples asociados a innumerables procesos biológicos. Han surgido muy temprano en la evolución, pero se han adaptado a las diferentes condiciones ambientales actuales. La Ecología microbiana tiene como objetivo estudiar la diversidad de los microorganismos en la naturaleza y las interacciones entre estos y el ambiente, analizando sus efectos en los ecosistemas y tratando de determinar las leyes que gobiernan estas interacciones. El término “ambiente” refiere a los factores físicos, químicos y biológicos y las diferentes fuerzas que actúan sobre un ser vivo (Madigan *et al.*, 2004; Frioni, 2011).

Existen tres enfoques posibles para el estudio de la diversidad microbiana, el taxonómico, el genético y el funcional (Zak *et al.*, 1994; Trevors, 1998). Este último ha sido muy utilizado en los últimos años como indicador de diversidad y estructura de las comunidades (Staddon *et al.*, 1997; Derry *et al.*, 1999; Anderson, 2003; Bending *et al.*, 2004; Conti, 2004; Montecchia *et al.*, 2011) ya que es muy sensible, además de ser menos costoso y complejo que los demás.

La estructura funcional de la comunidad microbiana puede abordarse mediante el estudio de los grupos funcionales. Estos son grupos de organismos formados por varias especies caracterizadas por la utilización de los recursos disponibles de manera similar, por lo tanto, compiten entre ellas y presentan respuestas o efectos similares sobre determinados procesos del ecosistema (Zamora *et al.*, 2012). Los ecosistemas con alta diversidad funcional son más productivos, resilientes y resistentes frente a determinados disturbios (Tilman *et al.*, 1997; Ricotta, 2005), y se puede considerar que, si en un ecosistema están presentes todos los grupos funcionales, se garantiza su funcionamiento, independientemente de la diversidad específica (Lawton y Brown, 1993). Esta última no es un buen indicador del estado de un ecosistema debido a la llamada “redundancia funcional”, que es la presencia en un ambiente de dos o más especies pertenecientes al mismo grupo funcional (Mayfield *et al.*, 2010) y que, por lo tanto, cumplen la misma función. Además, algunos microorganismos forman parte de más de un grupo funcional a la vez, y estos son clave para el funcionamiento del ecosistema (Pozuelo González, 1991).

En los diferentes ecosistemas, los organismos interaccionan con su medio y pueden modificar las características propias del mismo. Esto ocurre especialmente con los microorganismos que causan cambios químicos significativos en los agroecosistemas debido a sus actividades metabólicas asociadas al ciclo de los nutrientes. El ciclo biogeoquímico de un

nutriente, es aquel en el cuál el elemento químico experimenta cambios en su estado de oxidación al moverse dentro del ecosistema. Los microorganismos intervienen activamente en los ciclos y en muchos casos son los únicos agentes biológicos capaces de regenerar formas de un elemento utilizable por otros organismos, entre ellos las plantas (Frioni, 2011). Los ciclos de los nutrientes, de los cuales depende la biosfera en su conjunto, tienen etapas fundamentales que sólo se dan en el suelo, posibilitadas y afectadas por los seres vivos que dependen de estos elementos para vivir (Cerón Rincón y Melgarejo Muñoz, 2005). Las bacterias utilizan preferentemente los compuestos de bajo peso molecular y son más relevantes en la descomposición de exudados radicales, mientras que los hongos degradan fácilmente los residuos vegetales gruesos, ricos en polímeros. Es imprescindible el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos para garantizar el funcionamiento del ecosistema. Los factores que producen alteraciones a estos ciclos, indudablemente tienen un impacto negativo y, en la actualidad, las alteraciones antrópicas a los ciclos, en cuanto a su velocidad y a sus componentes han creado un desequilibrio que es necesario ponderar (Pozuelo González, 1991).

Los elementos más abundantes en la materia orgánica del suelo son el carbono y el nitrógeno. El contenido de carbono de los suelos varía según el tipo de suelo, las condiciones climáticas, el grado de intervención antrópica, etc. Los valores varían entre 1 y 3% en suelos minerales y entre 6 y 10% en praderas o bosques, y en las células representa del 40 al 50% de su peso seco. El carbono en las células vegetales se encuentra conformando diferentes macromoléculas, de las cuales, la celulosa constituye del 15 al 60% del peso seco de las células y las hemicelulosas del 10 al 30%, mientras que la lignina puede ser del 5 al 30% según edad o estadio del vegetal. En el suelo la descomposición de la celulosa es aproximadamente tres veces superior a la de la lignina y sólo los microorganismos eucarióticos muestran capacidad para degradar completamente esta última, debido a la estructura química de ambos compuestos. La celulosa se compone de polímeros de glucosa agregados en microfibrillas, las cuales presentan regiones cristalinas fuertemente unidas por puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals y regiones amorfas. Estas últimas constituyen el punto de entrada para los microorganismos degradadores de la celulosa. Por otro lado, la lignina es un grupo heterogéneo de compuestos formados por polímeros de fenilpropano con grupos alifáticos hidroxilos y carboxilos, insoluble en agua y resistente a la hidrólisis ácida, en agua caliente y solventes orgánicos, lo cual la vuelve el producto natural más recalcitrante, siendo un importante precursor de las moléculas húmicas y de la materia orgánica fosilizada (Frioni, 1999).

Los cultivos son una fuente muy importante de residuos ricos en celulosa. Los microorganismos celulolíticos son un grupo inespecífico que incluye diferentes tipos de

bacterias, hongos y protistas, por lo que la celulolisis ocurre en todo tipo de condiciones ambientales, variando la composición de la microflora al variar dichas condiciones. Este proceso puede ocurrir en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis, sequedad o anegamiento, pH entre 3 y 9 y temperatura de 0 a 65°C. Sin embargo, se ve favorecida por las mayores temperaturas, un pH neutro a ligeramente alcalino, condiciones de aireación y por la cantidad y calidad de los residuos vegetales, siendo preferible que los mismos sean ricos en celulosa, poco lignificados, de menor tamaño y mayor contenido de nitrógeno (Frioni, 1999). Cambios en el número de los microorganismos celulolíticos pueden implicar modificaciones en el contenido de materia orgánica del suelo y así brindar información acerca del estado del suelo y su productividad (Gaitán Bohórquez y Pérez, 2007).

El nitrógeno es otro de los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal y se encuentra frecuentemente como limitante del crecimiento de las plantas ya que es removido en cantidades superiores al resto de los nutrientes, por lo tanto, su nivel en los suelos es generalmente bajo. En los suelos agrícolas suele presentar valores que oscilan entre 0,02 y 0,4%, pudiendo alcanzar más del 2% en suelos orgánicos. La mayor parte del nitrógeno del suelo es orgánico (98% del total), no pudiendo ser asimilado directamente por las plantas, sino que debe ser mineralizado a formas inorgánicas por acción microbiana. La microflora responsable está integrada por un gran número de géneros y especies de bacterias, como también por hongos, actinomicetos y algas, según el proceso microbiano implicado. Las formas minerales (amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno atmosférico), representan sólo el 2% del nitrógeno del suelo, siendo el nitrato y el amonio las formas responsables de la nutrición vegetal (Frioni, 2011). La mineralización del nitrógeno orgánico se resume en los procesos microbianos de amonificación y nitrificación. En la amonificación se metabolizan moléculas nitrogenadas y se libera amonio como producto (Frioni, 1999). Los amonificantes son una gran variedad de microorganismos heterótrofos, como bacterias, hongos y protistas, los cuales pueden a su vez utilizar como sustrato una gran variedad de moléculas orgánicas nitrogenadas, por esta razón, la amonificación es poco sensible a los cambios ambientales. Se da tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, en suelos anegados o secos, en un rango de pH que va desde 3,5 para hongos y bacterias anaeróbicas hasta 9 para actinomicetos y algas, y un rango térmico que abarca toda condición compatible con la vida (Frioni, 1999).

En la nitrificación, el nitrógeno inorgánico en forma de amonio o nitrito se oxida respectivamente a nitrito y nitrato en dos procesos conocidos como nitritación y nitratación. Se trata de procesos de respiración aerobia con sustrato inorgánico (Frioni, 1999). Los nitrificantes son principalmente bacterias quimiolitotróficas aerobias de la familia Nitrobacteriaceae, con

cinco géneros nitritantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosobolus*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio*) y cuatro géneros nitratantes (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*) (Pozuelo González, 1991). Su crecimiento es lento y son difíciles de aislar, ya que suelen aparecer contaminantes en los medios de cultivo. Por ser tan pocos géneros y de gran similitud fisiológica, el proceso es muy sensible a las condiciones ambientales. No ocurre o es muy lento en suelos anegados, en pH muy ácidos (debajo de 5) o en temperaturas muy altas (superiores a 40°C) (Frioni, 1999). Además, este proceso es afectado por los niveles de carbono orgánico y nitrógeno total, mostrando una correlación negativa con el cociente carbono/nitrógeno (C/N) (Pozuelo González, 1991). Lo expuesto indica que la nitratación sería la etapa más sensible y por lo tanto la limitante en la mineralización del nitrógeno.

La fuente más abundante de nitrógeno es la atmósfera, de la cual compone el 78% en forma de moléculas de N₂ unidas por un triple enlace covalente muy estable, por lo que es prácticamente inerte e inaccesible para la mayoría de los seres vivos (Mayz-Figueroa, 2004). Los microorganismos diazótrofos son aquellos que poseen el mecanismo enzimático capaz de reducir el nitrógeno atmosférico hasta amonio asimilable en un proceso llamado Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN), y ésta constituye la fuente más importante de nitrógeno en los ecosistemas (Pozuelo González, 1991). Los microorganismos fijadores de nitrógeno son bacterias heterótrofas o autótrofas, aerobias, microaerófilas, anaerobias estrictas o facultativas. Algunas son fijadoras de vida libre y otras realizan la fijación en asociaciones simbióticas con otros seres vivos, entre los cuales se destacan las plantas. Estas asociaciones pueden ser laxas, como es el caso de microorganismos rizosféricos, espermatosféricos o filosféricos, o ser obligadas, tanto nodulares, como no nodulares (Frioni, 1999). La enzima nitrogenasa es la encargada de catalizar la FBN, proceso muy costoso energéticamente ya que se utilizan entre 12 y 24 moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por cada molécula de nitrógeno reducida. Esta enzima se inhibe con el oxígeno, por lo que los fijadores deben contar con mecanismos de protección.

El género *Azospirillum* es un grupo de diazótrofos heterótrofos de vida libre que forma rizocenosis asociativas con plantas de gran variedad de especies, aunque principalmente se trata de gramíneas, tanto cerealeras y forrajeras cultivadas, como pasturas naturales (Caballero-Mellado, 2001). Realizan la FBN ante la escasez de otras fuentes de nitrógeno asimilable y al realizar este proceso son microaerófilas, lo cual constituye su mecanismo de protección de la nitrogenasa. Se trata de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas, que fijan a expensas de exudados radicales y a su vez, producen fitohormonas que favorecen el desarrollo del sistema radical, lo que permite una mayor captación de nutrientes por parte de la planta. Por

ello se utilizan como inoculantes de cultivos, permitiendo una gran reducción en el uso de fertilizantes (Caballero-Mellado, 2001). Pueden crecer tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis si cuentan con una fuente de nitratos y carbono orgánico y su crecimiento es lento cuando dependen de la fijación del nitrógeno. Muestran una muy amplia distribución geográfica, son muy abundantes en regiones tropicales (temperatura óptima aproximada 30°C), aunque también se los encuentra en regiones templadas, frías y desérticas. Son más abundantes en suelos con pH neutros (óptimo 6 a 7,8), por debajo de 5 son escasos y no se aíslan de suelos con pH menores a 4,5. Son capaces de diferenciarse en estructuras similares a quistes que son formas de resistencia a la desecación, a la luz ultravioleta y al choque osmótico (Caballero-Mellado, 2001; Mayz-Figueroa, 2004; Paredes, 2013).

Los rizobios son bacterias de la familia Rhizobiaceae, capaces de inducir la formación de nódulos en las raíces de las plantas de la familia Fabaceae y en las del género *Parasponia* perteneciente a la familia Cannabaceae. Se conocen 12.000 especies de leguminosa capaces de formar esta asociación, la cual es responsable de aproximadamente el 50% de la FBN a nivel global (Paredes, 2013). Los rizobios son bacterias aeróbicas, heterótrofas, que pueden sobrevivir en vida libre con una fuente de nitrógeno asimilable y valiéndose de exudados radicales de diversas especies de plantas. Solamente pueden fijar nitrógeno como parte de la simbiosis con leguminosas, dentro del nódulo. En vida libre, no cuentan con mecanismos de protección para la nitrogenasa, para lo que dependen del macrosimbionte. Son muy sensibles a la acidez, son mesófilos y se ven afectados tanto por la sequía, como por la alta humedad que limita la provisión de oxígeno. Sin embargo, la tolerancia a bajos niveles de pH y altas temperaturas es muy variable entre cepas y tienen la capacidad de sobrevivir las épocas secas en capas profundas del suelo para luego recolonizar las capas superficiales, aunque no tienen la capacidad de formar esporas. Dentro del nódulo son capaces de desarrollarse en un rango más amplio de temperatura, pH y concentración de oxígeno, aunque siguen siendo muy sensibles a la humedad en ambos extremos. Las leguminosas ejercen efectos estimulantes sobre la población de rizobios del suelo a través de sus exudados y descamaciones de tejidos. El aporte de materia orgánica al suelo beneficia a este grupo ya que es fuente de nutrientes y regula el pH, aunque la presencia de fuentes de nitrógeno combinado inhibe la infección (Frioni, 1999).

Se han descrito seis géneros de rizobios, que son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Al principio las especies de microorganismos rizobianos se definían en base a la especificidad de huéspedes, ya que de hecho se trata de un proceso altamente específico, pero hoy en día se acepta que algunas especies pueden tener un amplio rango de huéspedes, como es el caso de *Bradyrhizobium*

japonicum, la cual puede nodular en soja, así como en un gran número de leguminosas tropicales. La infección comienza con el reconocimiento por parte de las bacterias de un huésped viable, a través de señales químicas liberadas por la raíz. Los rizobios se unen a los pelos radicales y penetran al tejido radical a través de los mismos, formando el tubo de infección. Cuando la infección llega hasta células adyacentes al pelo radical, estimulan la división de las células vegetales y se forma el nódulo. Las bacterias penetran el citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis y allí se dividen, se agrandan y se diferencian, formando bacteroides que son capaces de realizar la FBN. Dentro del nódulo, los bacteroides se nutren de fotosintatos aportados por la planta huésped y ésta obtiene los nutrientes nitrogenados producto de la fijación. Además, la planta expresa la proteína Leghemoglobina que regula la concentración de oxígeno en el nódulo y que le da al mismo su característico color rojizo. Cuando los nódulos mueren, los bacteroides vuelven al suelo y, aunque los mismos han perdido la capacidad de reproducirse, los nódulos también contienen formas latentes de rizobio no diferenciado, capaces de sobrevivir en el suelo y reinfectar tejidos vegetales (Wang *et al.*, 2001).

El aporte de nitrógeno que las plantas obtienen de la simbiosis con el rizobio, aunque no cubre la totalidad de sus requerimientos, reduce en gran medida la dependencia de los fertilizantes nitrogenados en cultivos extensivos de leguminosas como la soja y les permite crecer sin empobrecer tanto los suelos. *B. japonicum* fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha utilizado como inoculante de cultivos agrícolas durante más de cien años. Con la expansión del cultivo de soja en la Argentina en la década del '70, comenzó la introducción de rizobios a nuestros suelos. La repetida inoculación anual debida al monocultivo o a la rotación trigo/soja y las condiciones favorables de los suelos pampeanos en relación al contenido de materia orgánica, textura y pH, hicieron que los rizobios se naturalizaran en los suelos sojeros argentinos (Paredes, 2013).

Otra metodología, para el estudio de los microorganismos presentes en el suelo, es utilizar medios de menor selectividad que permiten el desarrollo de muchos tipos de microorganismos. Se denomina microflora total al conjunto de heterótrofos capaces de crecer en un medio no selectivo con extracto de suelo y una fuente de carbono y energía (Frioni, 1999). Por el tipo de medio (tripteína, peptona de soja y agar), y las condiciones de cultivo (aerobiosis y oscuridad, durante una semana) se seleccionan microorganismos aerobios, quimioheterótrofos y muy competitivos.

A su vez, la medición de actividad biológica global permite obtener información acerca de los microorganismos del suelo en su conjunto y es también un buen indicador del ciclaje de

la materia orgánica (Schnürer y Rosswall, 1982). El estudio de la actividad de diferentes enzimas permite evaluar los niveles de actividad microbiana a partir de las reacciones bioquímicas en el suelo (Toresani *et al.*, 2011). Las enzimas están presentes en el suelo por liberación, tanto por secreción como por lisis celular, de los macro, meso y microorganismos que en él habitan, aunque su mayor producción es atribuida a los microorganismos, por su gran biomasa, su alta actividad metabólica y su corto ciclo de vida. No son muy estables en el ambiente edáfico, donde están en riesgo de ser degradadas, inactivadas, adsorbidas o desnaturalizadas; pero una fracción de ellas es estabilizada al entrar en interacción con la fase sólida del suelo (Cerón Rincón y Melgarejo Muñoz, 2005). Dependiendo del tipo de enzimas seleccionadas, se puede evaluar la actividad enzimática global (hidrolasas), o la de grupos fisiológicos determinados asociados a los ciclos de los nutrientes (fosfatasas, ureasas, etc.). El método de Schnürer y Rosswall (1982) de determinación espectrofotométrica de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) es un método simple, rápido y sensible para determinar actividad enzimática global a través de la evaluación de un grupo de exoenzimas (lipasas, esterases y proteasas). Permite determinar la actividad de hongos, bacterias y protistas, e incluso células animales y se ha encontrado una correlación entre la hidrólisis del FDA y la respiración microbiana, por lo que es una buena medida de la actividad biológica global (Schnürer y Rosswall, 1982). Las actividades enzimáticas están muy relacionadas con propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, varían según factores naturales, como el clima, el tipo de suelo, la topografía, la profundidad, y factores antropogénicos, siendo muy sensibles a los cambios debidos al manejo. Una mayor actividad biológica es clave para la resiliencia y la sustentabilidad del suelo.

Propiedades físico-químicas del suelo:

En síntesis, puede afirmarse que la estructura funcional microbiana responde a características del ambiente edáfico, como humedad, temperatura, oxigenación, disponibilidad de sustrato orgánico, pH y fertilidad (Pozuelo González, 1991; Zamora *et al.*, 2012) y es influenciada positiva o negativamente por las condiciones de manejo, directamente asociadas a la salud del suelo. Por tal motivo, no se puede dejar de tener en cuenta la influencia de propiedades físico-químicas del medio en la comunidad microbiana y por extensión, en los ciclos biogeoquímicos y en las funciones ecosistémicas.

Los microorganismos son muy adaptables a las condiciones ambientales y han colonizado casi todos los ambientes terrestres, aun los más extremos, sin embargo, cada tipo microbiano y cada célula es en sí misma muy vulnerable a las condiciones ambientales (Frioni,

1999). No todos los microorganismos responden de igual manera a dichos factores ambientales, los cuales determinan la composición de la comunidad (Toresani *et al.*, 2011). En cuanto a la temperatura, en los ecosistemas predominan los microorganismos mesófilos, incluso como patógenos animales o durante el invierno, ya que desarrollan resistencia a bajas o altas temperaturas. Los termófilos abundan en sitios como pilas de restos orgánicos, donde la temperatura se eleva localmente y son los más activos metabólicamente (Frioni, 1999).

Otro factor de fundamental importancia por cómo afecta a la microflora del suelo es la materia orgánica. La materia orgánica condiciona muchas de las propiedades físico-químicas edáficas, que a su vez inciden en la vegetación y los macro, meso y microorganismos del suelo, por ello se lo considera como un indicador de la salud del suelo, con efectos positivos sobre la sustentabilidad del sistema productivo (Sainz Rozas *et al.*, 2011). Según Carreira (2011), la materia orgánica se define como “una larga serie de compuestos carbonados en diferentes estados de degradación y síntesis, provenientes de restos vegetales y animales y de la propia biota que en ella se desarrolla”, aunque también puede definirse de forma práctica como todo material orgánico que pasa por un tamiz de 2 mm (Anderson y Ingram, 1993; Morón, 2001). Los efectos benéficos incluyen principalmente la combinación con arcillas mejorando la estructura, el aumento en la capacidad de intercambio catiónico, el almacenamiento de agua útil, la aireación, la actividad quelante y buffer, la fuente y reserva de nutrientes, el reservorio temporal de carbono y la gran influencia en la persistencia y degradación de agroquímicos y contaminantes (Pozuelo González, 1991; Cerón Rincón y Melgarejo Muñoz, 2005; Carreira, 2011). El contenido de materia orgánica del suelo está determinado por el aporte de restos vegetales, exudados radicales, productos del lavado de hojas, restos animales y excrementos, y restos de microorganismos, y por los procesos de mineralización microbiana, que implican su transformación a formas inorgánicas. El clima, el tipo y el uso del suelo tienen una gran influencia en el contenido de materia orgánica y la actividad microbiana será más intensa en momentos de acumulación de materia orgánica y nitrógeno (Pozuelo González, 1991).

Según Sainz Rozas *et al.* (2011), en la Región Pampeana Argentina los pastizales naturales presentan los mayores valores de materia orgánica, mientras que los cultivos dan lugar a un descenso de estos valores, que dependiendo el tipo de labranza, el tipo y secuencia de rotación y la fertilización, han llegado a ser un 50% menores que la situación original, lo cual puede explicar la aparición de problemas generalizados, como la caída en la fertilidad y la propensión a la erosión. De acuerdo a la información recopilada por Sainz Rozas *et al.* (2011) a partir de 4.439 muestras en la provincia de Santa Fe, el contenido medio de materia orgánica del horizonte superficial del suelo (0 a 20 cm) es de 2,7% ($\pm 0,6\%$) y valores que varían entre

0,5 y 6,5%. A su vez, particularmente para el sur de la provincia de Santa Fe, la media es de 2,6%, ($\pm 0,5\%$), en contraste con los valores que caracterizan las condiciones prístinas, de promedio 4,3% ($\pm 1,1\%$), lo cual representa una reducción en contenido de materia orgánica del 39%. Esta reducción se debe principalmente a las fracciones lábiles de la materia orgánica, fundamentales para la estabilidad de los agregados y la provisión de nitrógeno. Los autores asocian esta caída con la prolongada historia agrícola y la elevada frecuencia de cultivo de soja en los esquemas de rotación. Esta afirmación se justifica considerando que todas las acciones de manejo que incrementen la entrada de carbono al suelo, como ser la rotación con pasturas, la mayor frecuencia de cultivos con gran aporte de carbono, la adecuada fertilización, el riego, entre otros, asociadas a labranzas conservacionistas, aumentarán el nivel de carbono en el suelo. Mientras que los ciclos de pastura aumentan rápidamente el contenido de carbono en el suelo, y los ciclos agrícolas provocan un descenso marcado del mismo, este efecto podría compensarse mediante la utilización de siembra directa y rotación con elevada frecuencia de gramíneas adecuadamente fertilizadas (Sainz Rozas *et al.*, 2011). No es posible determinar el contenido exacto de materia orgánica en el suelo, una aproximación posible es a través de la cuantificación del carbono orgánico, que es uno de sus constituyentes principales (Carreira, 2011).

No se puede dejar de considerar el contenido de humedad del suelo, un factor físico que influye enormemente en la microflora edáfica y en el desarrollo de la vegetación, pero que, a su vez, puede verse muy afectado por las condiciones de manejo. El efecto del contenido de humedad del suelo sobre las poblaciones microbianas es doble: por un lado, los microorganismos necesitan del agua como soporte vital, por el otro, el contenido de humedad es inversamente proporcional a la disponibilidad de oxígeno en el ambiente edáfico. Los microorganismos son sensibles a variaciones mínimas en la humedad, siendo este uno de los factores que más influye en la producción de biomasa edáfica, sin embargo, exceptuando situaciones de extrema sequedad, los microorganismos responden al nivel de aireación en el suelo, más que a la humedad en sí misma (Pozuelo González, 1991).

El agua está contenida en la matriz porosa del suelo y su magnitud es muy variable, en función de la cantidad que llega al sistema, las propiedades físico-químicas del suelo y la actividad de los seres vivos. Las precipitaciones proporcionan el agua que llega al suelo, mientras que el calor del sol, el viento y la sequedad del aire inducen la evaporación. La topografía determina la dirección del escurrimiento superficial. La profundidad, la textura, la estructura y el contenido de materia orgánica del suelo establecen el número, la proporción y la continuidad del espacio poroso, lo cual determina la cantidad de agua que el suelo puede absorber, retener y suministrar a la vegetación, así como también el intercambio de aire con la

superficie. La cobertura vegetal viva, incluso las malezas, y los residuos vegetales en superficie, incluso los provenientes del cultivo, tienen efectos positivos sobre el suelo. Producen sombreado reduciendo la temperatura del suelo y frenando la evaporación directa, reducen la escorrentía en favor de la infiltración al retener el agua, capturan la humedad del aire y protegen al suelo del impacto directo de las gotas de lluvia, que destruyen el sistema poroso superficial, formando costras. A su vez, la presencia de vegetación y mantillo aumenta el contenido de materia orgánica del suelo, lo cual ayuda al mantenimiento de la estructura, aumenta la protección contra el sellado superficial y favorece la presencia de micro, meso y macrofauna. Lombrices, escarabajos, hormigas y termitas, junto con las raíces de las plantas, conducen a una mejor integración de los residuos en el suelo y contribuyen a la creación de los macroporos. Un suelo más profundo, con mayor contenido de materia orgánica y con presencia de residuos vegetales tendrá más capacidad de almacenamiento de agua. La mayor proporción de microporosidad con respecto a la porosidad total permite al suelo una mayor retención de agua, pero la macroporosidad es fundamental para la efectiva infiltración y para impedir el anegamiento prolongado, que suele ser nocivo para los seres vivos. Tanto la profundidad del suelo, como la infiltración se ven muy afectadas por la compactación al reducirse la penetración de las raíces y destruirse los macroporos (FAO y UNESCO, 2006).

En cuanto al manejo, distintas prácticas pueden llevar a un aumento o una disminución de la humedad del suelo. Esta puede disminuir por manejos agrícolas convencionales, como la quema de residuos y la labranza intensiva, así como por deforestación, sobrepastoreo y monocultivo. El tránsito de maquinaria o animales, principalmente sobre suelos excesivamente húmedos, produce compactación. La labranza interrumpe la continuidad del espacio poroso, elimina el mantillo y provoca una disminución del contenido de la materia orgánica y de la actividad biológica del suelo.

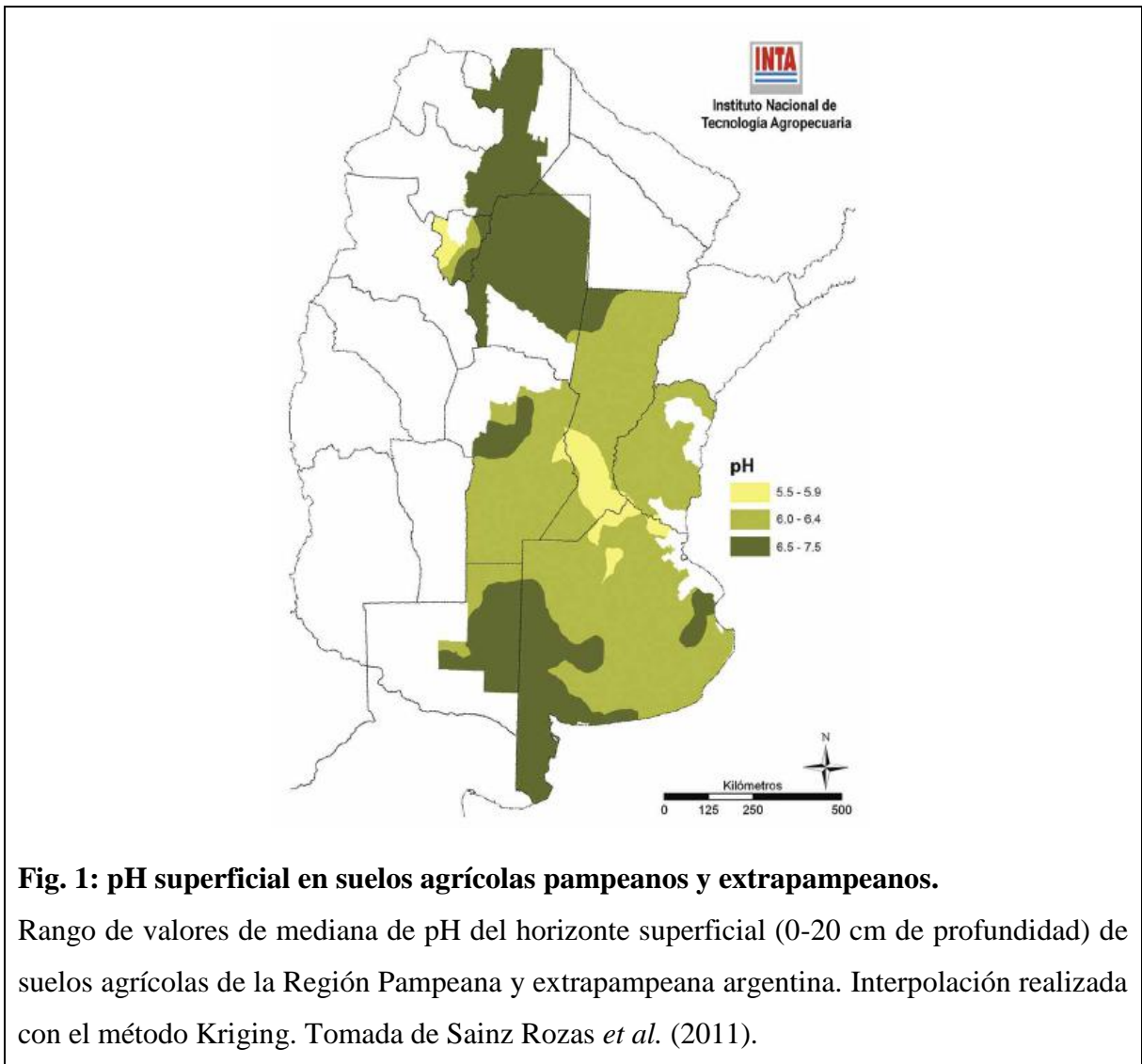
En cambio, las buenas prácticas agrícolas llevan a la conservación de la humedad y favorecen la percolación profunda sobre la escorrentía superficial, al preservar la porosidad estructural y mantener elevados los niveles de materia orgánica. La agricultura de conservación mejora las condiciones del suelo en cuanto a su actividad biológica (riqueza y diversidad) y capacidad de absorción, ya que se basa en el mantenimiento de una cobertura permanente en el suelo, con residuos o cultivos, la rotación de cultivos y el uso de cultivos de cobertura. La aplicación no excesiva de fertilizantes favorece el mantenimiento de la humedad al promover un mayor desarrollo de las plantas en superficie y de sus raíces. La variedad de sistemas radicales en un esquema de rotación favorece la formación de una red de canales en el suelo (Benites Jump y Castellanos, 2013). La siembra directa favorece el aumento del contenido de

humedad del suelo por la presencia de un mantillo vegetal, la ausencia de labranzas y un mayor contenido de calcio, magnesio y materia orgánica en la superficie del suelo (FAO y UNESCO, 2006; Duval *et al.*, 2015). La compactación en ganadería puede evitarse manejando el acceso del ganado a cada lote y limitando los períodos de pastoreo a los momentos en que el suelo está seco (FAO y UNESCO, 2006; Benites Jump y Castellanos, 2013). A su vez, la presencia de vegetación natural favorece la estructura del suelo y sus propiedades físicas, a diferencia de lo ocurrido con la mayoría de los cultivos o pasturas implantadas.

Según Ferreras *et al.* (2007) la intensificación agrícola de las últimas décadas en la Región Pampeana ha provocado una degradación de los suelos, con disminución del carbono orgánico total, de la disponibilidad de nutrientes y cambios en la estructura. Esto se refleja en un relevamiento realizado por Duval *et al.* (2015) en la Región Pampeana, donde se seleccionaron para cada localidad un lote natural y dos con manejos agrícolas considerados como malas prácticas y buenas prácticas. La agricultura se asoció a compactación, con reducción y modificación del sistema poroso, y se concluyó que las pasturas perennes generan un espacio poroso más continuo y estable que los cultivos anuales en siembra directa. Además, los niveles de carbono superficial fueron siempre mayores en ambientes naturales que bajo manejo agrícola, probablemente por la mayor masa de raíces y biomasa aérea y no se encontraron diferencias significativas en el carbono entre las malas y buenas prácticas agrícolas, ambas siempre por debajo del valor crítico inferior de 20g/kg. También encontraron que los suelos Argiudoles típicos de textura franco-limosa fueron más vulnerables que los otros tipos estudiados (Haplustol éntico de textura franco arenosa y Hapludert típico de textura franco arcillo limosa) a la intensificación agrícola y que en ellos, la rotación intensiva, considerada dentro de las buenas prácticas, mostró una disminución de la porosidad estructural respecto a la siembra directa en monocultivo, probablemente por el mayor tráfico de maquinaria.

Por último, se debe considerar el pH, un factor sumamente importante para caracterizar a los suelos, ya que afecta la formación de agregados, la movilidad de los iones, la solubilidad de minerales, las reacciones redox, el intercambio iónico, la disponibilidad de nutrientes, la actividad microbiana y la composición de la comunidad microbiana (Sainz Rozas *et al.*, 2011). En suelos de pH neutro predominan las bacterias, en pH alcalino, los actinomicetos y en pH ácido, bacterias fermentativas, anaerobias y hongos, que pueden sobrevivir aunque son neutrófilos y se ven favorecidos por la ausencia de competencia (Frioni, 1999). El pH de un suelo está determinado por el porcentaje de saturación de bases, que es menor en condiciones de acidez; por la naturaleza de los coloides, los cuales difieren en su capacidad de suministrar protones a la solución de suelo, desde los complejos orgánicos, que generan la mayor acidez,

seguidos de las arcillas, que varían según el tipo, hasta llegar a los óxidos de hierro y aluminio, que generan una menor disociación de hidrógeno y por tanto menor acidez; y por el tipo de cationes adsorbidos, siendo que H^+ , Mn^{2+} , Al^{3+} y Fe^{2+} generan suelos más ácidos, mientras que Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , este último en mayor medida, forman bases al hidrolizarse. El pH de un suelo puede variar en el tiempo, tanto por causas naturales, como por efectos antrópicos, como el manejo agrícola o la contaminación. La acidificación progresiva del suelo puede suceder por lixiviación de bases en momentos de exceso de agua; por un incremento en el aporte de materia orgánica; por acción de las raíces de las plantas, especialmente leguminosas, que extraen bases del suelo y liberan protones; y por el uso de fertilizantes de reacción ácida. Por el contrario, el uso de fertilizantes de reacción alcalina, el riego con aguas alcalinas y el exceso de bases, generalmente mayor en las especies dicotiledóneas, pueden provocar un aumento del pH del suelo. Todos estos cambios son moderados por la capacidad reguladora del suelo, ya que tanto los coloides inorgánicos como la fracción húmica tienen efecto buffer sobre la solución del suelo (Fernández, 2006). En regiones con uso agrícola intenso y prolongado, la remoción de bases por los cultivos, principalmente la soja, y la fertilización excesiva y repetida en el tiempo provocan la acidificación del suelo, sobre todo en capas superficiales del mismo (Sainz Rozas *et al.*, 2011). En suelos agrícolas, habría una variación usual de pH entre 4 y 10 (Fernández, 2006). En la Región Pampeana, la mayor parte de los suelos agrícolas presentan valores de pH en el rango de 6 a 7,5, los cuales se consideran óptimos para la actividad agrícola. Sin embargo, en el sur de Santa Fe, norte de Buenos Aires y este de Córdoba, se encuentran valores de pH entre 5,5 y 6, lo cual puede observarse claramente en el mapa de rangos de pH elaborado a partir de estos datos (**Fig. 1**) (Sainz Rozas *et al.*, 2011). Los autores explican estos valores a partir de la mayor exportación de bases en esta área, respecto a otras regiones agrícolas y a la prolongada historia de fertilización nitrogenada. A su vez, un menor contenido de materia orgánica, reforzaría estos efectos, ya que la misma confiere al suelo una mayor capacidad de amortiguación del pH.



Efectos de la vegetación y el manejo:

La vegetación es un regulador fundamental de la microflora del suelo, principalmente debido al aporte de materia orgánica proveniente de la deposición de restos vegetales, el lavado de hojas y los exudados radicales, que en muchos hábitats constituyen la principal fuente de energía para la microbiota. Además, genera microclimas, disminuye las fluctuaciones en la humedad del suelo y modifica el pH. Las raíces ayudan a la formación de estructura, favorecen la aireación, aumentan el contenido de nutrientes, afectan la composición iónica e impiden la erosión (Pozuelo González, 1991).

Según Morón (2001), el residuo vegetal natural o en forma de rastrojo influye en numerosas propiedades y procesos del suelo, tanto físicos y químicos, como biológicos. El material vegetal que llega al suelo es de composición heterogénea. Los principales componentes orgánicos del mismo en orden de importancia son: celulosa, hemicelulosa, lignina, compuestos

solubles en agua, como azúcares simples, aminoácidos y ácidos alifáticos, compuestos solubles en éter y alcohol, como grasas, aceites, resinas y pigmentos y finalmente, proteínas, que contienen la mayoría del nitrógeno y el azufre. Las cantidades de cada tipo de sustancia varían entre especies y en función del estado de desarrollo, así por ejemplo, en plantas de más edad, es mayor la proporción de celulosa y lignina y menor la de proteínas y compuestos hidrosolubles. La velocidad de descomposición de cada tipo de compuesto es diferente; primero desaparecen los azúcares y aminoácidos, a continuación las proteínas, luego la celulosa y mucho después la lignina. Además, la descomposición puede ralentizarse por escasez de ciertos nutrientes esenciales para los microorganismos degradadores, especialmente por la baja disponibilidad de nitrógeno en relación con la oferta de residuos carbonados. Durante los procesos de degradación del material vegetal, la necesidad de nitrógeno de los microorganismos depende de la cantidad de carbono del rastrojo. Cuando el residuo posee altos niveles de nitrógeno (C/N entre 20 y 30), durante su descomposición, que es rápida, los excesos resultan en amonificación neta y liberación de amonio al suelo. A niveles mayores de relación C/N, los microorganismos toman nitrógeno del suelo para degradar el carbono, disminuyendo la disponibilidad de nitrógeno para la vegetación, lo cual se conoce como inmovilización.

De este modo, el ambiente edáfico y la estructura funcional microbiana variarán en función de la composición y estructura de la comunidad vegetal y particularmente, en el caso de agroecosistemas, del sistema de rotación.

Existe numerosa bibliografía que describe los efectos de los esquemas de rotación sobre el suelo, particularmente en el contenido de materia orgánica, pero también en el pH, el contenido de humedad, la estructura del suelo, y la abundancia, composición y actividad de los microorganismos. Los rastrojos y, en consecuencia, el manejo, son fundamentales en el balance de materia orgánica del suelo, ya que constituyen una de las principales fuentes de entrada de carbono en suelos agrícolas. En este sentido, el principal factor es la cantidad de rastrojos que se devuelven al suelo por año. Según Morón (2001), para un determinado nivel de rastrojos, existe un nivel correspondiente de carbono orgánico en el suelo y la manera de obtener un aumento en el nivel de carbono es manejar el rastrojo, aumentando el tiempo que hay vegetación en el suelo, eliminando el laboreo, devolviendo el rastrojo al suelo, incorporando gramíneas perennes y leguminosas y rotando con maíz, sorgo u otros cultivos de rastrojos voluminosos con alta relación C/N. El efecto del esquema de rotación sobre el suelo es variable por lo que no existe un único sistema que sea ideal, sino que cada sitio, en cada momento, con sus particularidades, como historia de manejo, condiciones climáticas, topográficas, edáficas, etc., exige un manejo diferente (Abril *et al.*, 2005). La agricultura sustentable requiere que se

seleccione una secuencia de cultivos que permita mantener las propiedades edáficas en condiciones óptimas, devolviendo unos cultivos al suelo, lo que otros cultivos extrajeron (Villar y Romero, 1999).

Distintos cultivos generan residuos muy diferentes, en términos de volumen, relación C/N, velocidad de descomposición y, en consecuencia, aporte de materia orgánica y nitrógeno. Se suele distinguir por sus efectos entre dos tipos de residuos. Por un lado, los de baja calidad, que aportan gran cantidad de material de alta relación C/N y lenta descomposición que provocan inmovilización, como el maíz (C/N 60), el girasol y el sorgo. En contraposición, los de buena calidad, que dejan poco volumen de residuos ricos en nitrógeno y compuestos solubles que permiten su rápida descomposición y aportan nitrógeno al suelo, como la soja (C/N entre 20 y 30) (Ernst *et al.*, 2002). El trigo posee también rastrojos pobres en nitrógeno (C/N entre 70 y 80), pero el volumen de residuos es menor que en los demás cultivos mencionados (Galarza *et al.*, 2011). Los ciclos anuales trigo/soja tienen una mínima producción de rastrojo (Morón, 2001).

Los principales componentes de la materia orgánica humificada son los productos de degradación de la lignina y compuestos nitrogenados, por lo que, la degradación lenta de residuos ricos en carbono favorece la formación de nuevo suelo superficial (Abril *et al.*, 2005). Cultivos que aportan mayor cantidad de residuos de baja calidad tienen un efecto positivo en la materia orgánica del suelo, tanto en cantidad, como en calidad, ya que inducen al aumento neto de carbono a lo largo del tiempo, por eso suelen incluirse en los esquemas de rotación. Reemplazar un ciclo de cultivo trigo/soja, por un cultivo de verano rico en residuos, como el maíz, permite moderar el impacto sobre el suelo y mejorar las condiciones de fertilidad (Villar y Romero, 1999; Sawchik, 2001). Sin embargo, aunque, el monocultivo de maíz aportaría más carbono al suelo que la rotación maíz/soja (Sawchik, 2001), los residuos provenientes de leguminosas son una fuente de nutrientes y energía fundamental para los microorganismos del suelo y propician la entrada masiva de nitrógeno al ecosistema (Pozuelo González, 1991), necesaria para el mantenimiento de la vegetación. Por otra parte, el monocultivo de soja produce un marcado descenso en el contenido de carbono (Sawchik, 2001) y, por su rápida descomposición, el residuo de soja deja escasa cobertura sobre el suelo (Abril *et al.*, 2005). Es por eso que se consideran más sustentables a los manejos que incorporan las rotaciones con leguminosas y otros cultivos como el maíz. Según Ernst *et al.* (2002), la descomposición de residuos con alta relación C/N, se acelera en las rotaciones con cultivos de menor contenido de carbono, ya que la mezcla de rastrojos permite que los hongos tomen el nitrógeno de un residuo, mientras degradan el otro. Sin embargo, la rotación no sólo acelera la descomposición de los

residuos pobres en carbono, sino que, por el mismo efecto, retrasa la degradación del residuo de soja (Abril *et al.*, 2005). Esto permite equilibrar el aporte de nutrientes, la neo-formación de suelo y la cobertura vegetal.

Asimismo, la labranza influye mucho en la descomposición del rastrojo y el aporte de materia orgánica. Durante la década del '90, comenzó la incorporación de la siembra directa, como parte de un paquete de labranzas conservacionistas que, a través de la mantención de los rastrojos, favorece la conservación del agua e impide la erosión, entre otros muchos beneficios, lo cual aminoró el impacto sobre los agroecosistemas, aunque vino acompañada por un aumento en el uso de maquinarias y agroquímicos (Abril *et al.*, 2005). La siembra directa con rastrojo en superficie se considera como la alternativa de mayor sustentabilidad, ya que disminuye la velocidad de descomposición por ser menor el contacto del residuo con los microorganismos del suelo. También aumenta los niveles de inmovilización, disminuye la mineralización de la materia orgánica y aumenta la proporción de hongos en la microflora degradadora (Morón, 2001). Así, la siembra directa suele resultar en un aumento del contenido de materia orgánica superficial, con respecto a otras labranzas, aunque esto depende del manejo previo, la secuencia de cultivos y la fertilización (Sawchik, 2001). Sin embargo, aún bajo siembra directa, los monocultivos no generan una cobertura de la misma calidad que las rotaciones (Abril *et al.*, 2005) y los efectos de la siembra directa sobre el carbono orgánico se evidencian en sistemas donde los suelos están en buenas condiciones, mientras que en suelos degradados, no hay beneficio en este sistema (Sawchik, 2001).

Finalmente, se debe considerar el efecto de la rotación con pasturas. Según Abril *et al.* (2005), la rotación agrícola-ganadera que se practicó tradicionalmente en la Región Pampeana permitía el mantenimiento de las condiciones de fertilidad del suelo, pero a medida que este sistema se fue reemplazando por explotaciones únicamente agrícolas, se fue perdiendo calidad en los suelos. Según Sawchik (2001), al comparar sistemas agrícolas y agrícola-ganaderos con respecto al contenido de carbono orgánico, los primeros muestran una caída continua, mientras que los segundos ciclan en torno a los valores iniciales, con los mayores valores durante los ciclos de pastura, debido a la gran producción de biomasa y raíces, y los menores durante los ciclos agrícolas. Lo mismo sucede en cuanto al contenido de nitrógeno total, aunque los niveles de reposición dependerán de la composición de la pastura, particularmente de las especies leguminosas. Por el contrario, en rotaciones que no incluyan pasturas probablemente se dará un balance negativo del carbono. En un trabajo realizado por Villar y Romero (1999), para evaluar indicadores de fertilidad física y química en esquemas agrícola-ganaderos del centro de Santa Fe, se obtuvo como resultado que no había diferencia entre distintas secuencias de cultivos

agrícolas (trigo/soja, trigo/soja-girasol, trigo/soja-soja-sorgo-girasol y trigo/soja-sorgo-trigo/soja-girasol) y todas impactaban negativamente en los parámetros observados, en especial el contenido de materia orgánica y el pH (acidificación). Por ello, se concluyó que la sustentabilidad vendría dada por la reposición durante el ciclo de pasturas, en particular pasturas perennes consociadas. Esto cobra mayor relevancia en suelos más vulnerables (Villar y Romero, 1999). En síntesis, la incorporación de pasturas de gramíneas y leguminosas en los esquemas de rotación tiene efectos positivos sobre la materia orgánica, ya que disminuye la erosión y frena la mineralización neta. Además, los sistemas radiculares de las gramíneas generan un gran aporte de residuo vegetal y las leguminosas aportan grandes cantidades de nitrógeno (Morón, 2001).

Según Ferreras *et al.* (2012), la Región Pampeana ha sufrido una degradación progresiva por el uso de inadecuadas prácticas de manejo, como sistemas de labranza agresivos, y esquemas de cultivo como el monocultivo de soja o la rotación trigo/soja. Por esto los autores proponen la “intensificación agrícola sustentable” en base al cultivo de soja, usando siembra directa, rotación con gramíneas y cultivos de cobertura. En el estudio realizado, observaron que los parámetros microbiológicos permitieron diferenciar las situaciones de monocultivo, las de prácticas sustentables y las de situaciones de referencia con máxima conservación. Los autores concluyeron que la agricultura continuada produce un deterioro en el suelo y que el esquema propuesto impacta positivamente aminorando estos efectos. Bortolato *et al.* (2013) no hallaron diferencias significativas en actividad biológica global (FDA) y carbono orgánico total (COT) entre monocultivo de soja y rotaciones soja-trigo/soja-maíz, en ensayos realizados en el sur de Santa Fe, aunque si hallaron efectos positivos de la presencia de cultivos de cobertura.

Indicadores de salud y calidad del suelo:

La relación entre los factores ambientales es extremadamente compleja, por lo que la consideración de sus efectos sobre la microflora es difícil y puede llevar a conclusiones contradictorias. Conocer en profundidad al conjunto de factores que más afectan a los microorganismos y sus interacciones permite contar con información más concreta para explicar la situación de las poblaciones microbianas, de la vegetación y del suelo en sí mismo (Pozuelo González, 1991). Es muy útil la evaluación conjunta de indicadores físicos, propiedades químicas y bioindicadores para cuantificar los efectos del disturbio agrícola sobre la salud del suelo (Duval *et al.*, 2015). En los últimos años se ha incrementado el interés en evaluar este recurso no renovable, debido al impacto negativo que provocan la intensificación agrícola y el empleo de prácticas de manejo inadecuadas en vastas zonas del planeta (Doran y

Parkin, 1996; Lal, 1999). Según Cerón Rincón y Melgarejo Muñoz (2005), salud y calidad del suelo, en relación con el mantenimiento de sus funciones, forman parte del concepto de sustentabilidad. Para valorar estos conceptos, se utilizan como indicadores diversos parámetros físicos, químicos y biológicos, que se deben analizar dentro de un marco espacio-temporal, contemplando que hay aspectos que por cuestiones de escala no pueden saberse ni predecirse sin incertidumbre. La salud del suelo depende de características ecológicas, es decir, que se cumplan los ciclos de los nutrientes y los flujos de energía y que haya resistencia y resiliencia ante los distintos posibles disturbios. La calidad del suelo tiene que ver con la productividad de los cultivos, el mantenimiento de la calidad del agua y el aire, y la salud de los seres vivos, incluido el ser humano. Las prácticas de manejo impactan en los parámetros que determinan la salud y la calidad. Ambos atributos llevan a la sustentabilidad.

Antecedentes:

En este trabajo, se aplicó el enfoque microbiológico funcional, mediante el estudio de grupos funcionales relacionados con los ciclos de los nutrientes, por recuento de viables en medios de cultivos sólidos o líquidos y en plántulas, para evaluar el efecto de distintos manejos sobre las comunidades microbianas del suelo. Este enfoque se combinó con la valoración de otros parámetros físicos, químicos y biológicos de uso común, que permiten ampliar y explicar la información aportada por el estudio de los grupos funcionales. El enfoque microbiológico funcional ha sido utilizado anteriormente como medio para evaluar calidad de suelos bajo distintos manejos, por ejemplo, Vallejo *et al.* (2011) evaluaron el efecto del uso de suelo sobre la densidad de bacterias nitrificantes y desnitrificantes, en las cuencas de los ríos La Vieja y Otún en la Ecorregión cafetera colombiana. Encontraron una alta sensibilidad de las bacterias a cambios en su microhábitat por lo que concluyeron que tendrían un gran potencial para ser utilizadas como indicadores de la calidad de los suelos. Resultados similares fueron obtenidos por Varela *et al.* (2004) quienes estudiaron la abundancia y riqueza de bacterias proteolíticas y celulolíticas como indicadores de calidad del suelo bajo diferentes usos en una zona cafetera colombiana y concluyeron que la abundancia de bacterias celulolíticas podría ser considerada como un indicador del efecto del cambio de uso de suelo.

Este enfoque se ha utilizado también, para evaluar el impacto en el suelo de disturbios relacionados con la producción agropecuaria en otras regiones de nuestro país. Abril *et al.* (1990) analizaron la evolución estacional de la microflora en un Haplustol típico de la región semiárida central de la provincia de Córdoba, comparando dos manejos contrastantes (monocultivo de soja y pastura consociada) y utilizando áreas de vegetación natural como

testigo. Pudieron observar que las variaciones en la densidad de microorganismos como respuesta a las labranzas estuvieron en función de la calidad (relación C/N) y cantidad del sustrato incorporado, siendo superiores en el cultivo de soja, aunque la actividad microbiana global fue superior en el testigo.

A su vez, Abril y González (1999) estudiaron el impacto que tiene sobre el suelo la utilización del fuego como estrategia de manejo de pastizales ganaderos en bosque serrano chaqueño de la provincia de Córdoba. Encontraron una disminución significativa de las densidades bacterianas, especialmente nitrificantes y amonificantes, lo cual podría relacionarse con la capacidad del suelo de recuperarse del disturbio a mediano plazo. Por último, Toresani *et al.* (1998) aplicaron la cuantificación de microorganismos celulolíticos aeróbicos como indicador del impacto de distintas prácticas de manejo, en relación con la ubicación del rastrojo, sobre la salud del suelo. Para ello compararon tres tipos de labranza (cincel, labranza cero y labranza vertical) en campos bajo rotación agrícola con maíz, trigo y soja en la Pampa Húmeda y concluyeron que es la labranza cero la que muestra las mayores densidades de microorganismos celulolíticos, los cuales mostraron ser sensibles a la ubicación del rastrojo en el perfil del suelo.

Hipótesis:

Los cambios en la composición y cuantificación de las poblaciones microbianas son indicadores del deterioro de las propiedades edáficas como consecuencia del manejo.

Objetivo general:

Evaluar el efecto sobre la microbiología del suelo de diferentes actividades antrópicas, comparando suelos con distintas historias recientes de manejo (monocultivo de soja, rotación agrícola y rotación agrícola-ganadera) y tomando como referencia una clausura de 32 años de antigüedad.

Objetivos específicos:

- 1- Cuantificar grupos funcionales de microorganismos asociados al ciclo del carbono y del nitrógeno.
- 2- Evaluar la actividad enzimática global de la microbiota del suelo.
- 3- Caracterizar propiedades físico-químicas de los suelos en estudio.
- 4- Establecer relaciones entre las variables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio:

Ubicación geográfica y características del suelo

El estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario en la localidad de Zavalla (32° 43' S; 60° 55' O), en un suelo Argiudol vértico serie Roldán (horizonte A11: arcilla 237 g/kg, limo 741 g/kg). Se trata de un suelo profundo, bien drenado y con un perfil muy evolucionado (Soil Survey Staff, 2014). Se encuentra dentro de la Pampa levantada u ondulada (Tricart, 1973; Pasotti, 1981), que es una cuenca sedimentaria rellena con sedimentos loésicos depositados en el Holoceno.

Clima y condiciones meteorológicas

El clima de esta región es templado cálido y húmedo (Burgos, 1970). La temperatura media anual es de 17°C. El promedio anual de precipitaciones es de 985,6 mm, siendo fundamentalmente estivales, coincidiendo con el momento de mayor demanda hídrica como consecuencia de la alta evapotranspiración (Sacchi *et al.*, 2000).

Los datos meteorológicos se obtuvieron de la estación meteorológica de la Facultad de Ciencias Agrarias ubicada en el Campo Experimental a poca distancia de los lotes muestreados. Considerando el año previo a la toma de muestras, es decir, entre noviembre 2013 y octubre 2014, la temperatura media del aire fue de 18,0°C y las precipitaciones acumuladas fueron de 1.026,8 mm (**Tabla 1**).

Durante el año previo a la toma de muestras se registraron ciertas anomalías climáticas que cabe tener en cuenta, a saber:

- El verano 2013/2014 presentó la ola de calor más importante de que se tenga registro según el Servicio Meteorológico Nacional (Infobae, 2013), con persistencia de días con temperaturas mínimas y máximas extremas (**Fig. 2**). Tanto en diciembre como en enero las temperaturas máximas superaron los 38°C y fueron escasos los días con temperaturas por debajo de 30°C.
- A lo largo del año las precipitaciones superaron en más de 100 mm la media de la región y se distribuyeron en forma irregular. Diciembre fue bastante seco, mientras que en los primeros 11 días de febrero cayeron más de 250 mm. Los meses de otoño/invierno fueron más secos que la media y agosto fue el caso

extremo, ya que no llovió en todo el mes (**Fig. 3**) (Bolsa de Comercio de Rosario, 2014a).

- En la época invernal hubo temperaturas que en general estuvieron por encima de los valores normales para el invierno (Bolsa de Comercio de Rosario, 2014b). Las temperaturas máximas ascendieron mostrando marcadas anomalías para esa época del año y luego hubo un descenso brusco de temperaturas. El máximo valor se registró el 21 de agosto con 31,9 °C y el mínimo el 27 de agosto con -1.2 C, lo que implica un salto térmico de 33 °C en tan sólo seis días (**Fig. 2**).

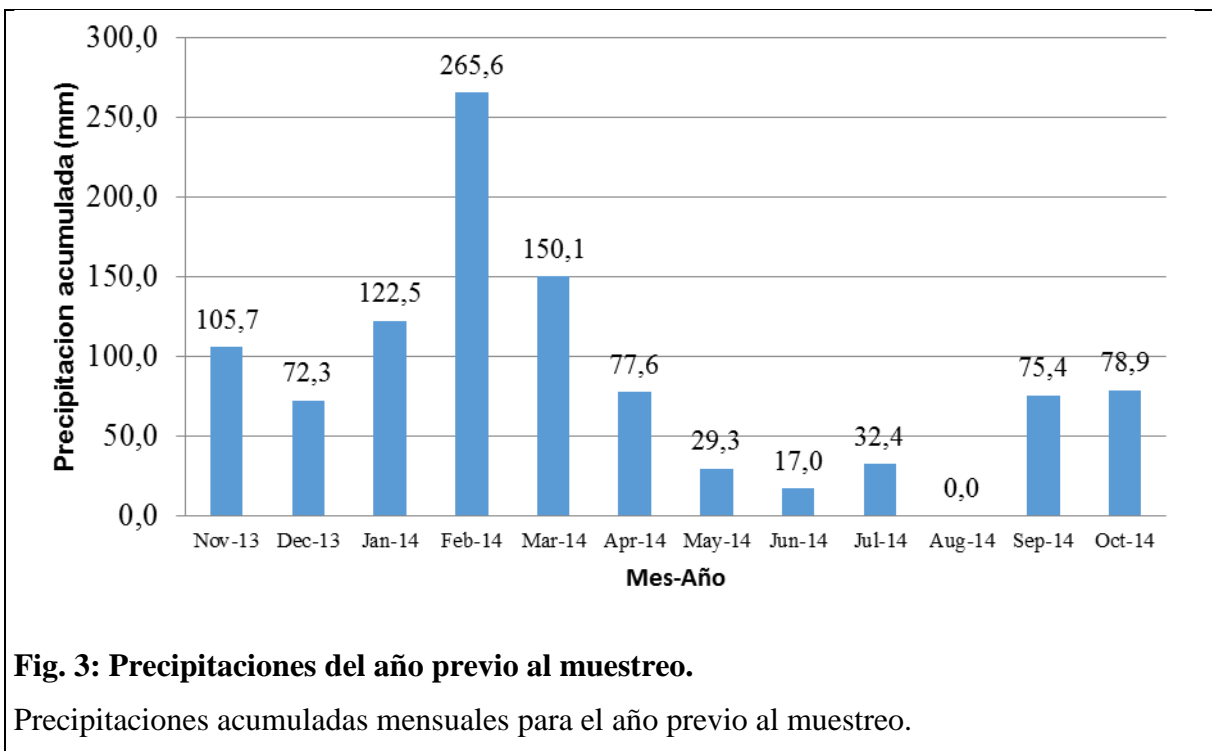
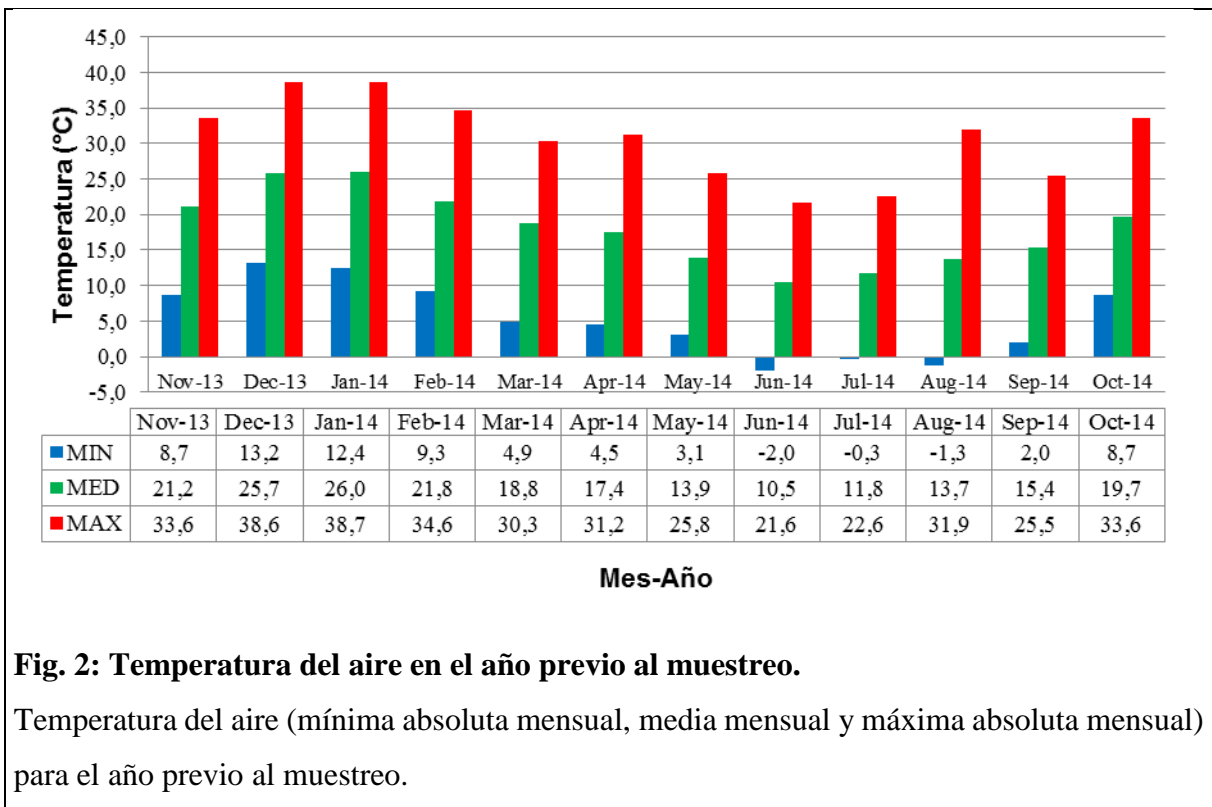
(a)	TEMPERATURA DEL AIRE (°C)					PRECIPITACIONES (mm)	HUMEDAD RELATIVA (%)	TEMPERATURA DEL SUELO (°C)			
	(medias mensuales)			(Extremas absolutas)		(acumuladas mensuales)	(medias mensuales)	(medias mensuales)			
	MIN	MED	MAX	MIN	MAX		MED	5 cm 9 hs	5 cm 15 hs	10 cm 9 hs	10 cm 15 hs
Nov-13	15,1	21,2	26,8	8,7	33,6	105,7	72,0	19,0	28,3	19,7	26,4
Dec-13	18,8	25,7	32,8	13,2	38,6	72,3	69,8	22,4	32,9	24,4	31,1
Jan-14	19,2	26,0	32,4	12,4	38,7	122,5	73,6	23,4	32,9	24,2	31,1
Feb-14	17,6	21,8	26,6	9,3	34,6	265,6	89,6	19,3	27,1	17,1	24,3
Mar-14	8,6	18,8	25,3	4,9	30,3	150,1	80,5	18,8	25,8	18,0	24,6
Apr-14	12,2	17,4	23,3	4,5	31,2	77,6	81,2	20,1	26,7	16,1	22,5
May-14	9,3	13,9	18,9	3,1	25,8	29,3	88,9	12,2	19,1	12,6	17,5
Jun-14	4,4	10,5	17,2	(-2,0)	21,6	17,0	82,1	9,3	16,9	9,6	15,3
Jul-14	6,4	11,8	17,3	(-0,3)	22,6	32,4	82,3	9,4	16,6	9,4	14,8
Aug-14	6,9	13,7	21,1	(-1,3)	31,9	0,0	75,6	10,8	20,5	10,5	17,8
Sep-14	9,1	15,4	21,4	2,0	25,5	75,4	79,4	14,8	21,5	14,4	19,9
Oct-14	13,6	19,7	25,9	8,7	33,6	78,9	76,6	19,4	26,1	19,1	25,0
Total	11,8	18,0	24,1	-2,0	38,7	1.026,8	79,3	16,6	24,5	16,2	22,5

(b)	PRECIPITACIONES (mm) (acumulada semanal)	PRECIPITACIONES (mm) (acumulada mensual en octubre)	TEMPERATURA DEL AIRE (°C) (media semanal)
Semana			
08/10 al 17/10 de 2014	16,8	52,0	16,5

(c)	TEMPERATURA DEL AIRE (°C)			PRECIPITACIONES (mm)	HUMEDAD RELATIVA (%)	TEMPERATURA DEL SUELO (°C)			
	MIN	MED	MAX		MED	5cm, 9hs	5cm, 15hs	10cm, 9hs	10cm, 15hs
17-Oct	25,7	12,6	20,5	0,0	74	20,2	27,1	19,6	24,8

Tabla 1: Información meteorológica de Zavalla previa al muestreo.

Datos meteorológicos (a) del año previo, (b) de la semana previa (Bolsa de Comercio de Rosario, 2014b) y (c) del día del muestreo.



En el **Anexo I** se pueden ver otros gráficos correspondientes a los datos meteorológicos del año previo a la toma de muestras.

Muestreo:

Las muestras fueron tomadas el día 17 de octubre de 2014.

Los lotes seleccionados para este estudio (**Fig. 4**) incluyeron las siguientes situaciones de manejo, a las cuales llamaremos tratamientos, haciendo la aclaración de que no son realmente tratamientos en el sentido estadístico:

1- **Monocultivo (M)** de soja desde la campaña 2005/2006 hasta el presente, en barbecho al momento del muestreo (Lote 5).

2- **Rotación (R)** agrícola soja-trigo/soja-maíz desde la campaña 2005/2006 hasta el presente, con cultivo de trigo al momento del muestreo (Lote 5).

3- **Pastura (P)** consociada de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (12 kg/ha), festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) (6 kg/ha), cebadilla (*Bromus catharticus* Vahl) (4 kg/ha) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) (0,5 kg/ha), sembrada en el año 2012 siguiendo un ciclo de rotación de 5 años de soja-cebada/maíz-pastura (Lote 12).

4- **Clausura (C)** de 32 años de antigüedad (Lote C).

Se definieron tres sectores (**I, II y III**) (**Fig. 5**) para cada situación y de cada uno de ellos se extrajo una muestra de suelo compuesta de 15 sub-muestras a los 0–7,5 cm de profundidad. Las muestras se tamizaron utilizando un tamiz de 2 mm y se conservaron en heladera a 4°C, hasta el momento de realizar los análisis.

Análisis de laboratorio:

Como parámetros microbiológicos, se midió la actividad enzimática global y se determinaron densidades microbianas de los diferentes grupos fisiológicos por gramo de suelo por diferentes métodos de recuento de viables en medios de cultivos sólidos o líquidos o en plántulas en caso de rizobios naturalizados. La composición de los medios de cultivo puede verse en el **Anexo III**:

- **Celulolíticos (Cel)**: siembra de diluciones seriadas de suelo en medios de cultivo selectivos para recuento por el método del Número Más Probable (NMP) (Alexander, 1987; Toresani *et al.*, 2011).
- **Amonificantes (Amo)**: siembra de diluciones seriadas de suelo en medios de cultivo selectivos para recuento por el método del NMP (Frioni, 2011).
- **Nitrificantes (oxidantes del amonio y del nitrito) (Nit)**: siembra de diluciones seriadas de suelo en medios de cultivo selectivos para recuento por el método del NMP (Schmidt y Belser, 1994).
- **Fijadores de N₂ de vida libre (Azo)**: se tomó como referente al género *Azospirillum*. Se evaluó mediante siembra de diluciones seriadas de suelo en medio de cultivo agar-Rojo Congo para recuento en placa (Cassán *et al.*, 2013).
- **Fijadores simbióticos de N₂ (Riz)**: Se tomó como referencia a los rizobios y se evaluó por la técnica de recuento de viables por el método del NMP en plántulas de soja creciendo en vermiculita-perlita estéril ((Peticari *et al.*, 2013). Se realizaron diluciones seriadas de suelo y se inocularon las semillas germinadas, evaluando la nodulación. Se usaron las tablas de Fisher y Yates (NMP) (Frioni, 2011). Se utilizaron semillas de soja estériles con un poder germinativo de 80%.
- **Microorganismos heterótrofos aerobios totales (HT)**: siembra de diluciones seriadas de suelo en medio de cultivo agar-tripteína-soja (TSA) para recuento en placa (Toresani *et al.*, 2011).
- **Actividad enzimática global (FDA)**: determinación de la actividad de un grupo de enzimas que incluye proteasas, lipasas y esterases por el método de medición espectrofotométrica de la hidrólisis del Diacetato de Fluoresceína (Schnürer y Rosswall, 1982).

Para la caracterización físico-química de los suelos se evaluaron los siguientes parámetros:

- Carbono orgánico total (COT) y contenido de materia orgánica (MO): por mezcla oxidante fuerte en escala semi-micro (IRAM-SAGyP 29571-2, 2011). [%MO = %COT x 1,724 (factor de Van Benmelen)].
- Contenido de humedad (Hum): por diferencia de pesaje tras secado a la estufa a 110°C hasta peso constantes. [Factor humedad (Fh) = Masa del suelo húmedo/Masa del suelo seco].
- Acidez (pH): medición con potenciómetro en una suspensión suelo-agua en una relación 1: 2,5.

Análisis estadístico de los datos:

Para el análisis univariado de los datos se aplicó comparación de medias utilizando ANOVA (Análisis de la Varianza) y el test de Tukey de comparaciones múltiples (Zar, 1999), en los casos que así lo requirieron, mediante el programa libre R, versión 3.1.3 (R Core Team, 2015). El ANOVA permite comparar las situaciones de manejo para cada variable individualmente, mientras que el test de Tukey se utilizó porque las situaciones a comparar eran más de dos.

El análisis multivariado se utilizó para comparar las situaciones de manejo mediante el conjunto de todas las variables, y poder describir además las relaciones entre las variables. Para el análisis multivariado se realizaron Análisis Canónico de Coordenadas Principales mediante el programa libre CAP (Anderson, 2004), y Análisis PerMANOVA (MANOVA no-paramétrico basado en permutaciones) (Anderson, 2001) y Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) utilizando el programa PC-ORD (licencia del sitio perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, licencia de usuario perteneciente a la Catedra de Ecología Agrícola) (McCune y Mefford, 2011). PerMANOVA y CAP utilizan permutaciones de los datos para obtener las probabilidades de significancia, lo que permite trabajar con variables que no cumplan con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos por otros tests multivariados, como sucede en este trabajo. PerMANOVA y CAP se utilizan de manera complementaria, ya que permiten detectar diferencias significativas en situaciones distintas, trabajando con un conjunto de variables. Además, mientras PerMANOVA sólo indica si hay diferencias significativas, CAP produce un gráfico de ordenamiento que ilustra claramente las diferencias existentes entre situaciones y entre grupos de muestras pertenecientes a cada situación. Otros métodos de ordenamiento en los que no se indica la presencia de grupos pueden no llegar a detectar la diferencia entre los mismos (Pillar y Orlóci, 1996). Por otra parte, CCA

permite relacionar dos matrices de datos, correspondientes a variables diferentes pero manteniendo en común las muestras, lo cual es conveniente en estudios ecológicos donde se incluyen variables biológicas y ambientales. De esta manera se puede detectar y observar gráficamente qué variable ambiental explica mejor el comportamiento de cada variable biológica. El CAP y el PerMANOVA se trabajaron utilizando una matriz de ocho variables (los seis recuentos, materia orgánica y actividad enzimática global), se seleccionó la Distancia Euclídea como medida de disimilitud, y el número de aleatorizaciones elegido fue 4.999. Para el CCA se correlacionaron dos matrices, una con los seis recuentos microbianos (Cel, Amo, Nit, Azo, Riz y HT) y la otra con los tres parámetros físico-químicos de suelo (MO, Hum y pH). La variable FDA se excluyó por no tratarse de una variable ambiental ni de un grupo funcional microbiano, sino que la misma es una consecuencia de la actividad de diferentes grupos microbianos en el suelo. Para evaluar su relación con el resto de las variables y obtener más detalles acerca del nivel de correlación entre cada par de variables, se elaboró una matriz de correlación usando Excel (2016).

Se consideró un error experimental del 10%.

RESULTADOS

Análisis de laboratorio:

Los resultados obtenidos de los diferentes recuentos y mediciones para los cuatro tratamientos con sus tres sectores se muestran en la **Tabla 2** a continuación.

	Cel	Amo	Nit	Azo	Riz	HT	FDA
	(n° mo / g _{ss})			(UFC / g _{ss})	(n° mo / g _{ss})	(UFC / g _{ss})	(µg Flu. / (g.h))
CI	2,39E+03	3,32E+06	5,42E+02	5,71E+06	2,92E+02	8,23E+06	82,616
CII	8,85E+02	1,23E+06	5,45E+02	8,58E+06	1,06E+02	8,44E+06	54,480
CIII	1,21E+03	1,21E+06	5,38E+02	8,48E+06	6,06E+01	1,06E+07	53,840
RI	2,39E+02	2,99E+06	1,08E+04	4,86E+06	5,49E+03	4,34E+06	48,145
RII	1,79E+02	1,64E+06	5,61E+03	4,02E+06	5,85E+03	1,73E+06	45,064
RIII	2,98E+03	2,98E+05	4,77E+02	3,10E+06	1,55E+03	1,79E+06	48,449
MI	9,12E+04	1,09E+06	1,82E+03	5,03E+06	2,07E+03	2,39E+06	63,546
MII	3,01E+05	3,01E+06	4,81E+02	1,28E+06	3,97E+03	2,25E+06	81,494
MIII	9,45E+04	3,15E+06	1,15E+03	3,15E+06	1,76E+03	1,63E+06	84,202
PI	1,44E+03	1,12E+06	1,12E+04	1,33E+07	1,61E+03	1,30E+07	148,000
PII	9,50E+04	1,14E+06	5,06E+03	6,12E+06	1,39E+03	1,45E+07	168,255
PIII	1,83E+03	3,05E+06	2,44E+04	8,04E+06	1,50E+03	1,11E+07	150,999

	MO	Hum	pH
	(%)	(adimensionales)	
CI	5,164	1,327	5,380
CII	5,487	1,362	5,440
CIII	5,606	1,346	5,600
RI	4,076	1,194	5,170
RII	4,035	1,194	5,250
RIII	4,273	1,192	5,160
MI	3,902	1,216	5,370
MII	3,614	1,203	5,430
MIII	3,960	1,261	5,400
PI	6,011	1,240	5,310
PII	6,569	1,266	5,390
PIII	5,826	1,219	5,420

Tabla 2: Resultados de laboratorio.

En las columnas se observan las diez variables (Celulolíticos – Cel, Amonificantes – Amo, Nitrificantes – Nit, Fijadores de N₂ de vida libre – Azo, Fijadores simbióticos de N₂ – Riz, Actividad enzimática global – FDA, Materia orgánica – MO, Humedad – Hum y pH). Los

recuentos de Azo y HT se expresan en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de suelo seco (g_{ss}), los demás recuentos microbianos están expresados como número de microorganismos (mo) por g_{ss} . FDA está expresado como microgramos de Fluoresceína por gramo por hora. En las filas se observan las muestras pertenecientes a los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P), cada uno dividido en tres sectores (I, II y III).

Análisis estadístico de los datos:

Análisis de la Varianza y Test de Tukey

El recuento de Cel dio como resultado que $M \gg P > C > R$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 6a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a M de C y R (**Fig. 6b**). La media de M es 122,44 veces mayor que la media entre C y R (**Tabla 3**).

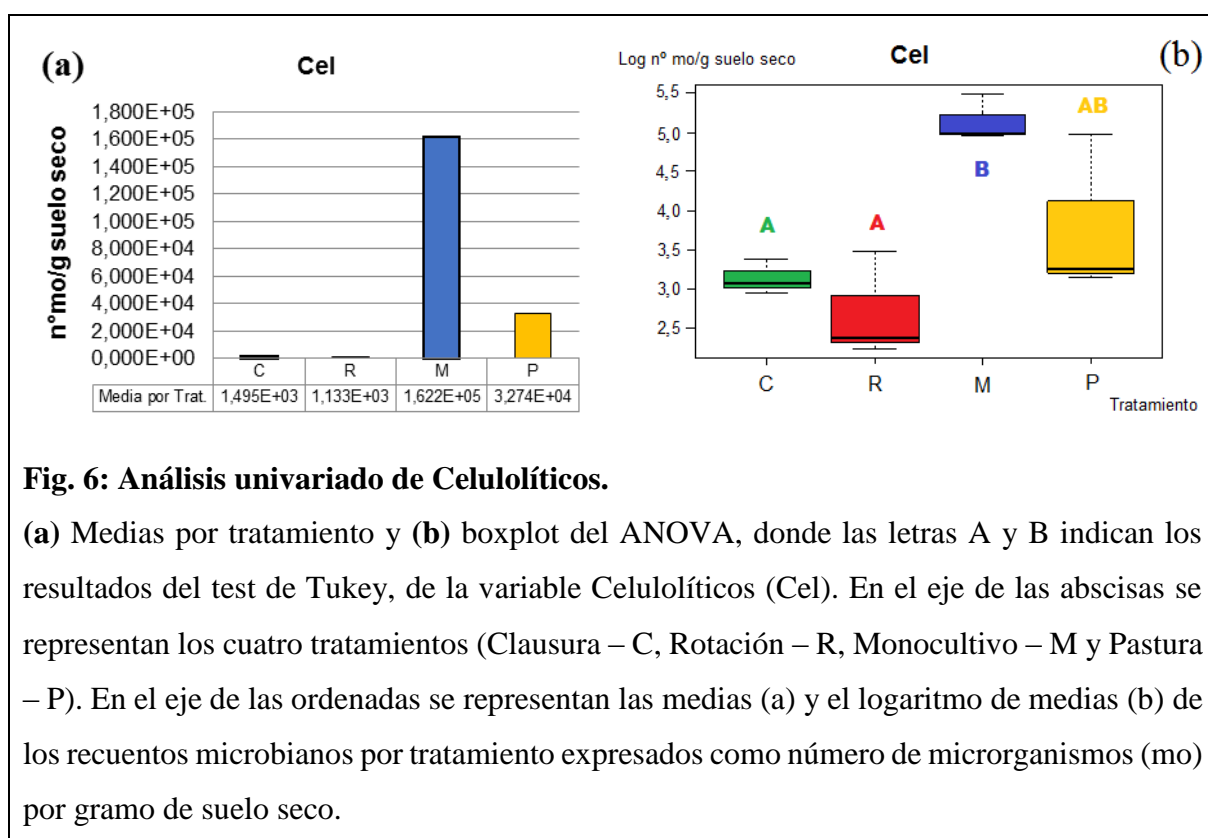


Fig. 6: Análisis univariado de Celulolíticos.

(a) Medias por tratamiento y (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable Celulolíticos (Cel). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como número de microorganismos (mo) por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Media	Relación
M	1,622E+05	123,44
C y R	1,314E+03	1

Tabla 3: Comparación de medias de Celulolíticos.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R y Monocultivo – M) de la variable Celulolíticos.

El recuento de Amo dio como resultado que $M > C > P > R$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 7a**). Sin embargo, el análisis de la varianza no reveló la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (**Fig. 7b**). Se observó desarrollo microbiano en la mayor parte de los sectores y en todas las diluciones.

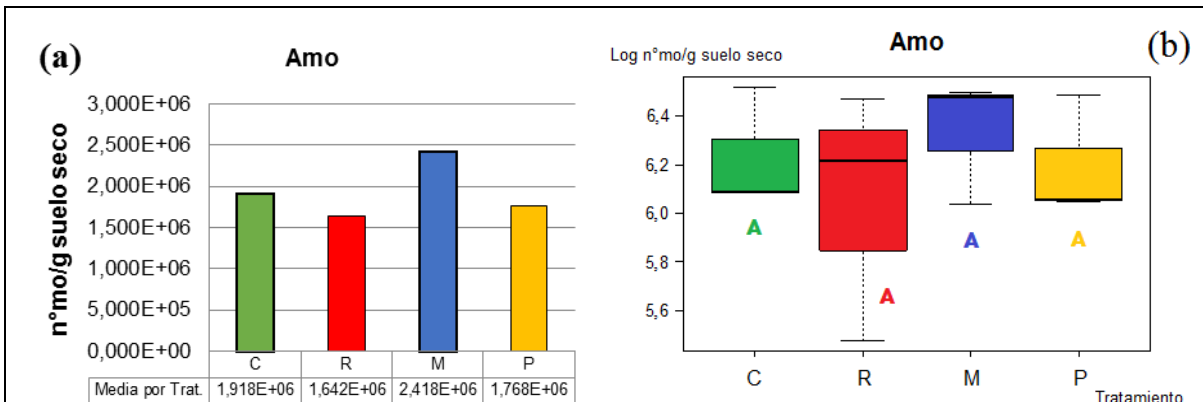


Fig. 7: Análisis univariado de Amonificantes.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde la letra A indica los resultados del test de Tukey, de la variable Amonificantes (Amo). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como número de microorganismos (mo) por gramo de suelo seco.

El recuento de Nit dio como resultado que $P > R > M > C$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 8a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a P de C y M (**Fig. 8b**). La media de P es 14,97 veces mayor que la media entre C y M (**Tabla 4**). El desarrollo de los nitrificantes fue muy lento en general, excepto en la pastura y en el primer sector de la rotación.

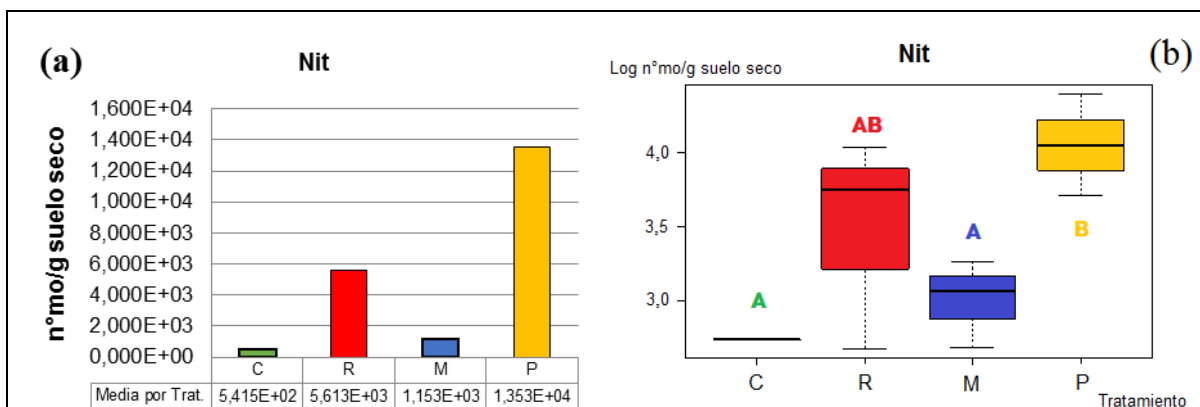


Fig. 8: Análisis univariado de Nitrificantes.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable Nitrificantes (Nit). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como número de microorganismos (mo) por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Media	Relación
P	1,353E+04	15,97
C y M	8,473E+02	1

Tabla 4: Comparación de medias de Nitrificantes.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Nitrificantes.

El recuento de Azo dio como resultado que $P > C > R > M$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 9a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a C y P de M (**Fig. 9b**). La media entre P y C es 1,66 veces mayor que la media de M (**Tabla 5**).

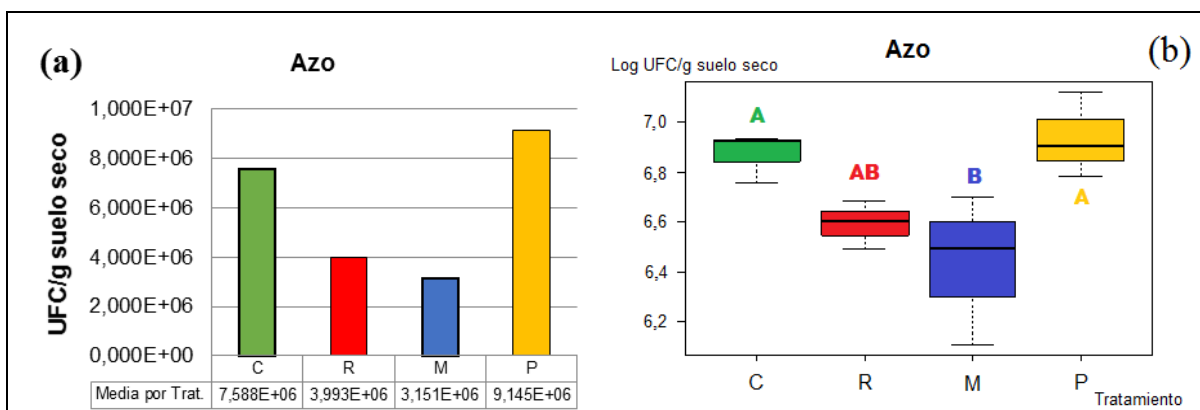


Fig. 9: Análisis univariado de Fijadores de N₂ de vida libre.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable Fijadores de N₂ de vida libre (Azo). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Media	Relación
C y P	8,367E+06	2,66
M	3,151E+06	1

Tabla 5: Comparación de medias de Fijadores de N₂ de vida libre.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Fijadores de N₂ de vida libre.

El recuento de Riz dio como resultado que $R > M > P > C$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 10a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a C de los otros tres tratamientos (**Fig. 10b**). La media entre R, M y P es 17,32 veces mayor que la media de C (**Tabla 6**).

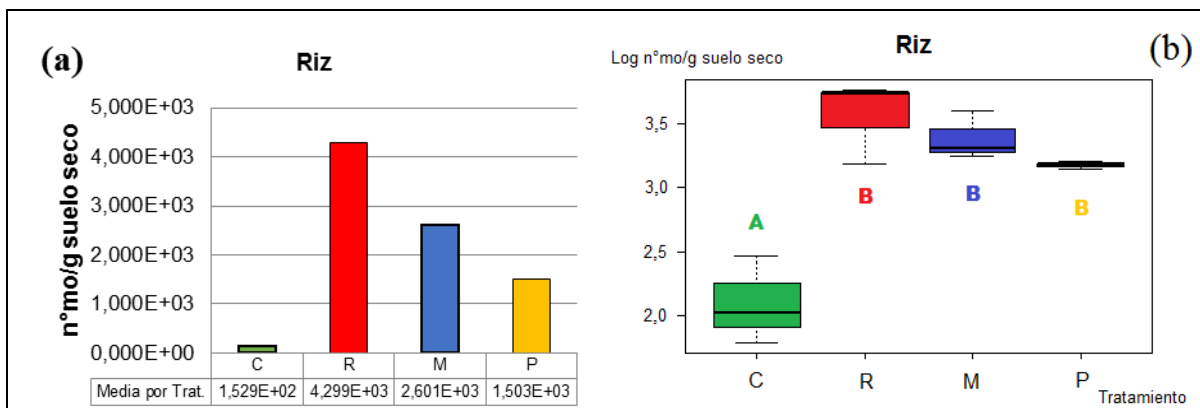


Fig. 10: Análisis univariado de Fijadores simbióticos de N₂.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable Fijadores simbióticos de N₂ (Riz). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como número de microorganismos (mo) por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Media	Relación
R, M y P	2,801E+03	18,32
C	1,529E+02	1

Tabla 6: Comparación de medias de Fijadores simbióticos de N₂.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Fijadores simbióticos de N₂.

El recuento de HT presentó como resultados en los recuentos que $P > C > R > M$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 11a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a C y P de R y M (**Fig. 11b**). La media entre P y C es 3,67 veces mayor que la media entre R y M (**Tabla 7**). A pesar de que no es la finalidad de este estudio identificar géneros y especies de microorganismos, cabe destacar que, aunque R y M presentaron un número semejante de colonias por placa, se observó mayor diversidad en las características culturales de las colonias (tamaño, forma, color, etc.) en R con respecto a M.

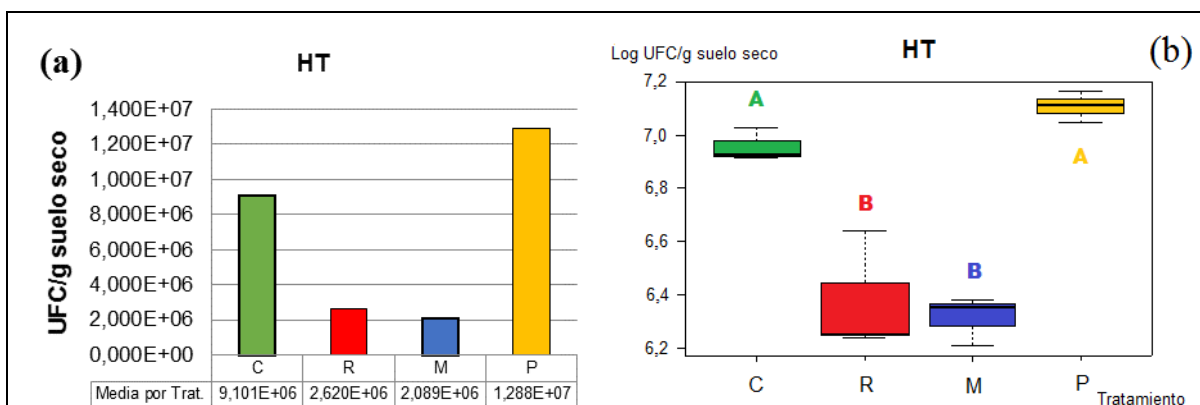


Fig. 11: Análisis univariado de Heterótrofos aerobios totales.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable Heterótrofos aerobios totales (HT). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de los recuentos microbianos por tratamiento expresados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Media	Relación
C y P	1,099E+07	4,67
R y M	2,355E+06	1

Tabla 7: Comparación de medias de Heterótrofos aerobios totales.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Heterótrofos aerobios totales.

La medición de FDA dio como resultado que $P > M > C > R$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 12a**). A su vez, el análisis de la varianza permitió diferenciar significativamente a P de los demás tratamientos y a M de R, respectivamente (**Fig. 12b**). La media de P es 1,22 veces mayor que la media entre C y M y 1,81 veces mayor que la media entre C y R. La media de M es 0,62 veces mayor que la media de R (**Tabla 8**).

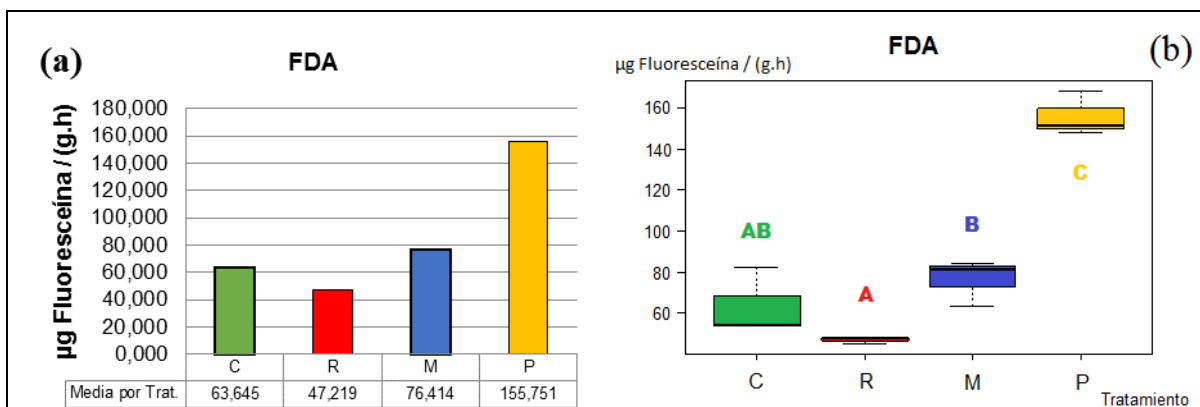


Fig. 12: Análisis univariado de Actividad enzimática global.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A, B y C indican los resultados del test de Tukey, de la variable Actividad enzimática global (FDA). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias (a) y el logaritmo de medias (b) de FDA, medida en microgramos de Fluoresceína por gramo por hora.

Tratamiento	Media	Relación	
P	155,751	2,22	2,81
C y M	70,030	1	
C y R	55,432		1
M	76,414	1,62	
R	47,219	1	

Tabla 8: Comparación de medias de Actividad enzimática global.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Actividad enzimática global.

La medición de MO dio como resultado que $P > C > R > M$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 13a**). A su vez, el análisis de la varianza permitió diferenciar significativamente a P de C y a ambos de R y M (**Fig. 13b**). La media de P es 0,13 veces mayor que la media de C y 0,54 veces mayor que la media entre R y M. A su vez, la media de C es 0,36 veces mayor que la media entre R y M (**Tabla 9**).

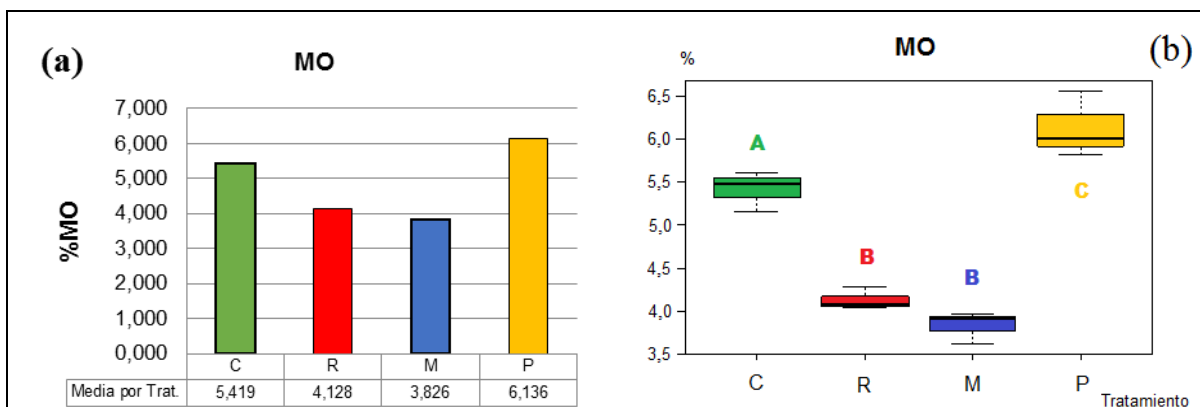


Fig. 13: Análisis univariado de Materia orgánica.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A, B y C indican los resultados del test de Tukey, de la variable Materia orgánica (MO). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias de MO, expresadas en %.

Tratamiento	Media	Relación	
P	6,136	1,54	1,13
C	5,419	1,36	1
R y M	3,977	1	

Tabla 9: Comparación de medias de Materia orgánica.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Materia orgánica.

La medición de Hum dio como resultado que $C > P > M > R$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 14a**). A su vez, el análisis de la varianza permitió diferenciar a C de los demás tratamientos y a P y R entre sí (**Fig. 14b**). La media de C es 0,09 veces mayor que la media entre M y P y 0,11 veces mayor que la media entre R y M. La media de P es 0,04 veces mayor que la media de R (**Tabla 10**).

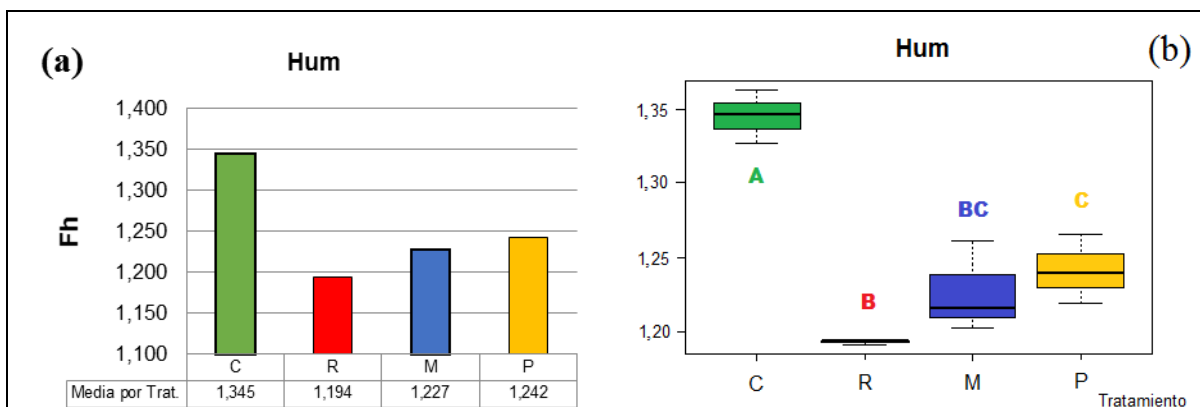


Fig. 14: Análisis univariado de Humedad.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A, B y C indican los resultados del test de Tukey, de la variable Humedad (Hum). En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias del Factor humedad (Fh), que es adimensional.

Tratamiento	Media	Relación	
C	1,345	1,09	1,11
M y P	1,235	1	
R y M	1,211		1
P	1,242	1,04	
R	1,194	1	

Tabla 10: Comparación de medias de Humedad.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable Humedad.

La medición del pH dio como resultado que $C > M > P > R$ al comparar las medias por tratamiento (**Fig. 15a**). Sin embargo, el análisis de la varianza sólo permitió diferenciar significativamente a R de los demás tratamientos (**Fig. 15b**). La media entre C, M y P es 0,04 veces mayor que la media de R (**Tabla 11**).

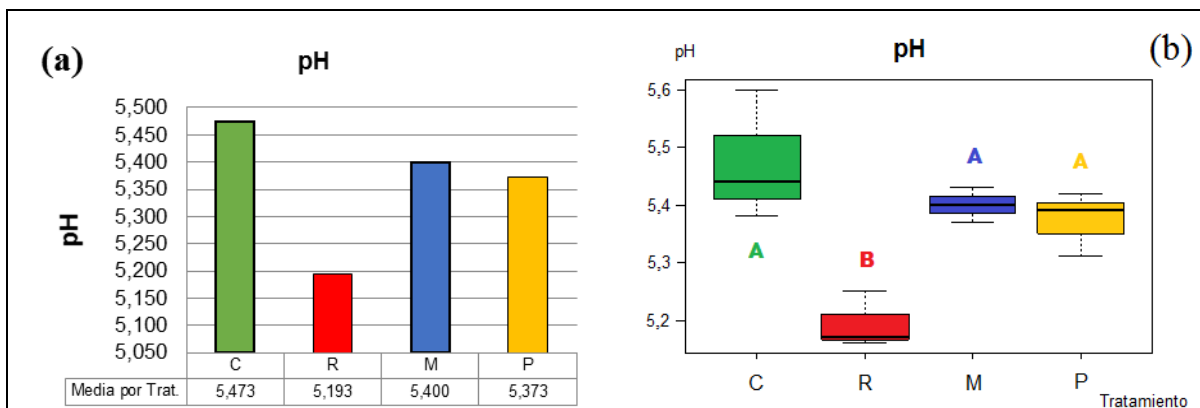


Fig. 15: Análisis univariado de pH.

(a) Medias por tratamiento, (b) boxplot del ANOVA, donde las letras A y B indican los resultados del test de Tukey, de la variable pH. En el eje de las abscisas se representan los cuatro tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). En el eje de las ordenadas se representan las medias del pH, que es adimensional.

Tratamiento	Media	Relación
C, M y P	5,415	1,04
R	5,193	1

Tabla 11: Comparación de medias de pH.

Comparación de las medias entre tratamientos que presentan diferencias significativas (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) de la variable pH.

Análisis multivariante de la varianza no-paramétrico basado en permutaciones

El análisis PerMANOVA dio como resultado que existen diferencias significativas entre los 4 tratamientos, con una probabilidad de error de 0,0002 (**Tabla 12a**). El test de comparaciones múltiples reveló que cada par de tratamientos presenta diferencias significativas entre sí con excepción de R y M ($p < 0,1$) (**Tabla 12b**).

(a) Fuente de variación	d.f.	SS	MS	F	P
Factor	3	238,84	79,612	36,468	0,000200*
Residual	8	17,464	2,1831		
Total	11	256,30			

(b) Tratamientos	T	P
C vs. R	2,2848	0,096000*
C vs. M	2,6037	0,096000*
C vs. P	6,8906	0,098400*
R vs. M	3,7893	0,101000
R vs. P	9,5856	0,094600*
M vs. P	7,1106	0,094400*

Tabla 12: Resultados del PerMANOVA y del Test de Comparaciones Múltiples.

(a) Resultado del análisis PerMANOVA y (b) resultado del Test de Comparaciones Múltiples entre tratamientos (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P). (*) indica diferencias significativas ($p < 0,1$). Los valores de probabilidad en (b) no están corregidos para comparaciones múltiples. Grados de libertad (d.f.), suma de cuadrados (SS), cuadrados medios (MS), estadístico F de Snedecor (F), nivel de significación (p), estadístico t de Student (t).

Análisis Canónico de Coordenadas Principales

Los test de permutación incluidos en el programa corroboraron la existencia de diferencias significativas entre los cuatro tratamientos (**Tabla 13**). El Análisis Canónico de Coordenadas Principales dio como resultado un gráfico donde se ve una clara separación entre los tratamientos y los sectores de cada tratamiento se mantienen juntos; el eje 1 segrega principalmente a P de los demás tratamientos; y el eje 2 diferencia a C de R y M (**Fig. 16**).

Test	Resultado	P
Trace statistic	$\text{tr}(Q_m'HQ_m) = 2,815194$	0,0002*
First squared canonical correlation	$\text{delta}_1^2 = 0,993198$	0,0134*

Tabla 13: Resultado de los Tests de Permutación.

Resultados de los test de permutación que acompañan al CAP, (*) indica diferencias significativas ($p < 0,1$). Nivel de significación (p).

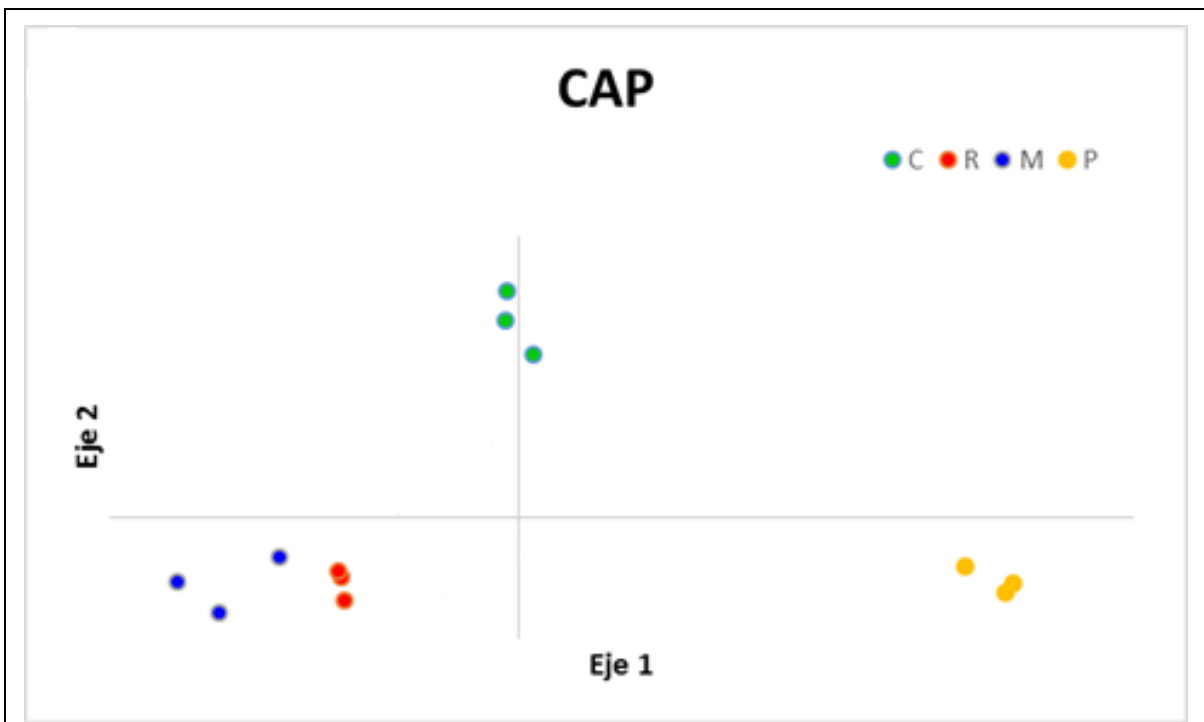


Fig. 16: Ordenamiento resultante del Análisis Canónico de Coordenadas Principales (CAP).

Ordenamiento de las muestras pertenecientes a cada tratamiento (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P).

Análisis de Correspondencia Canónica

El Análisis de Correspondencia Canónica realizado entre los recuentos (Grupos funcionales) y las variables del suelo (Ambiente) dio como resultado tres ejes canónicos los cuales explican un 51,2% de la varianza de los grupos funcionales. El eje 1 explica un 26,6% de la varianza y muestra una correlación entre los grupos funcionales y el ambiente de 0,727 y 0,936, no paramétrica y paramétrica respectivamente. El eje 2 explica un 19,5% de la varianza y muestra una correlación entre los grupos funcionales y el ambiente de 0,273 y 0,583, dependiendo del tipo de correlación considerada. El eje 3 explica un 5,1% de la varianza y muestra una correlación entre los grupos funcionales y el ambiente de 0,545 y 0,800, dependiendo del tipo de correlación considerada (**Tabla 14**). En el gráfico correspondiente al CCA (**Fig. 17**), se representan los resultados de los dos primeros ejes canónicos, ya que son los que dan mayor información. El mismo muestra la influencia de las variables ambientales sobre cada grupo funcional considerado. De este modo, puede verse que tanto Azo, como HT están principalmente influenciadas por el aumento en el contenido de MO y Hum en el suelo y en menor medida también se relacionan con mayores valores de pH. Por otro lado, la abundancia de Amo está muy relacionada con valores de pH tendientes a la neutralidad, aunque también se

asocia a mayores contenidos de Hum y está poco influenciada por el contenido de MO. En cambio, Cel se relaciona con bajos valores de MO, mayores de pH y no está influenciada por el contenido de Hum; Nit se asocia a menores valores de pH y Hum y no está influenciada por el contenido de MO y finalmente, Riz se asocia a valores bajos de Hum, MO y pH. Aunque no tienen significado estadístico, la representación de las muestras junto con las variables en este gráfico, permite ver cuáles son las variables que caracterizan en mayor medida a cada tratamiento. La clausura se caracteriza por valores relativamente altos de las tres variables ambientales, principalmente la humedad, y se relacionaría con una mayor abundancia de *Azospirillum spp.* y heterótrofos totales y con la baja abundancia de fijadores simbióticos, nitrificantes y celulolíticos. La rotación se asocia en general con valores menores de las tres variables ambientales y con la mayor abundancia de microorganismos nitrificantes y fijadores simbióticos. El monocultivo se ve asociado a contenidos bajos de materia orgánica y humedad, y está caracterizado por la mayor abundancia de microorganismos celulolíticos y fijadores simbióticos y por la menor abundancia de nitrificantes, *Azospirillum spp.* y heterótrofos totales. La pastura está generalmente caracterizada por un mayor contenido de materia orgánica y en general tiene contenidos elevados de microorganismos, salvo celulolíticos. Los resultados que pueden extraerse de la lectura del gráfico de CCA confirman la información extraída de los análisis univariados y reflejan las correlaciones entre las variables.

Número de ejes canónicos: 3			
Varianza total ("inercia") en los datos de grupos funcionales: 0.0172			
	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Varianza en los datos de los grupos funcionales			
% de varianza explicada	26,6	19,5	5,1
% de varianza explicada acumulada	26,6	46,2	51,2
Correlación de Pearson, Grupo funcional-Ambiente	0,936	0,583	0,800
Correlación de Kendall (Rank), Grupo funcional-Ambiente	0,727	0,273	0,545

Tabla 14: Resumen estadístico de los ejes resultantes del Análisis de Correspondencia Canónica.

Varianza explicada por cada uno de los tres ejes canónicos y magnitud de dos tipos de Correlación Grupo funcional-Ambiente para cada eje.

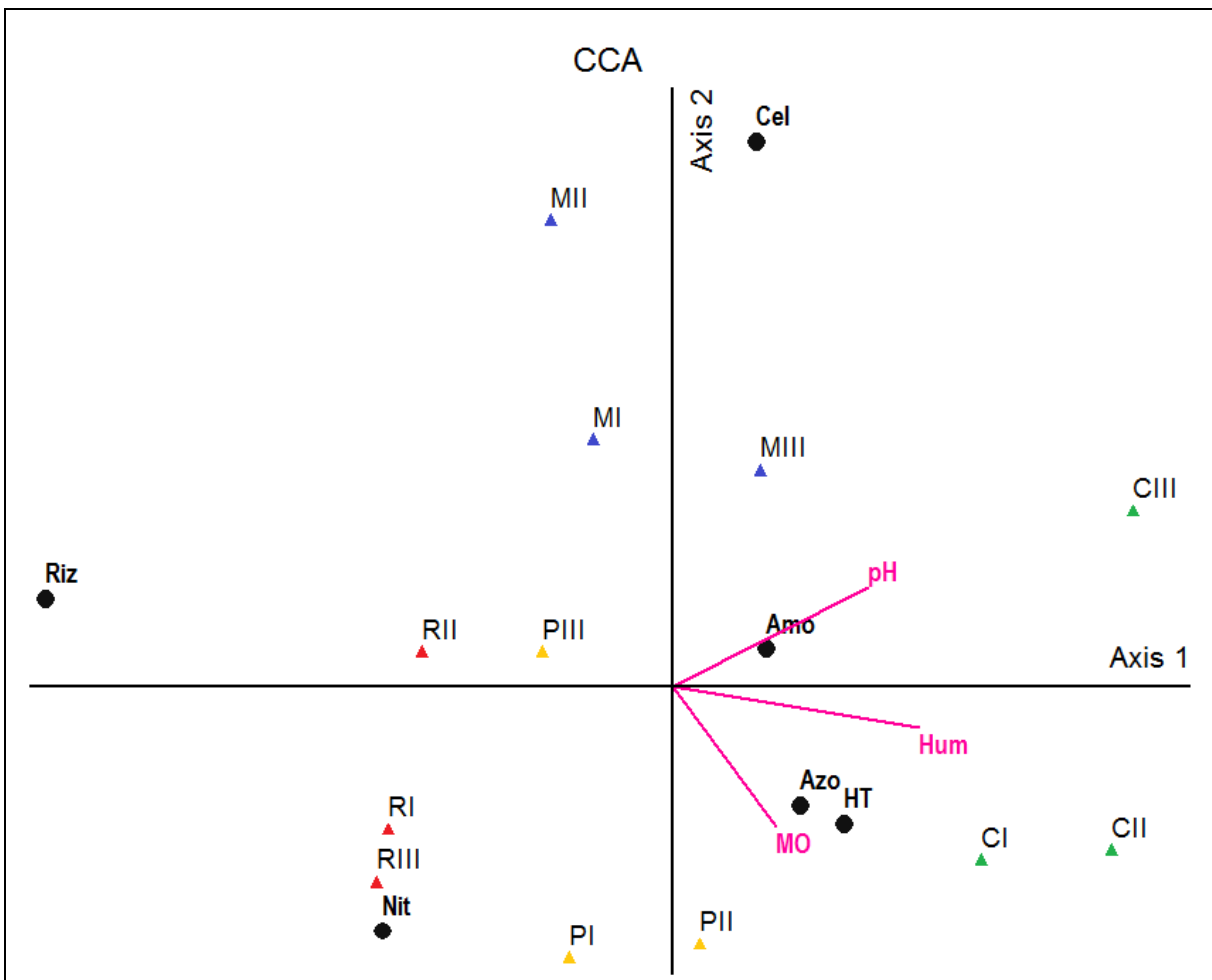


Fig. 17: Distribución relativa de las variables y las muestras con respecto a los ejes resultantes del Análisis de Correspondencia Canónica.

Distribución relativa de las variables (Celulolíticos – Cel, Amonificantes – Amo, Nitrificantes – Nit, Fijadores de N₂ de vida libre – Azo, Fijadores simbióticos de N₂ – Riz, Actividad enzimática global – FDA, Materia orgánica – MO, Humedad – Hum y pH) y las muestras diferenciadas por tratamiento (Clausura – C, Rotación – R, Monocultivo – M y Pastura – P) y sector (primero – I, segundo - II y tercero - III) con respecto a los ejes canónicos 1 y 2.

Correlaciones

El resultado de los cálculos de las correlaciones entre cada par de variables se muestra en una matriz de correlación (**Tabla 15**) como detalle de las asociaciones mostradas en el gráfico anterior. HT y MO tienen una correlación positiva muy alta y ambas tienen una correlación positiva alta con Azo, al igual que HT con FDA. Azo tiene una correlación positiva moderadamente alta con Nit, FDA y Hum, lo mismo que Nit y FDA entre sí. HT tiene una

correlación positiva moderadamente alta con pH y Hum, lo mismo que pH y Hum entre sí. MO tiene una correlación positiva moderadamente alta con FDA y Hum. Riz tiene una correlación negativa alta con Hum y una negativa moderadamente alta con Azo, HT, MO y pH. Cel tiene una correlación negativa moderadamente alta con Azo.

	Cel	Amo	Nit	Azo	Riz	HT	FDA	MO	Hum	pH
Cel	1,000									
Amo	0,268	1,000								
Nit	-0,300	0,271	1,000							
Azo	-0,549*	-0,298	0,406*	1,000						
Riz	0,223	0,246	0,184	-0,461*	1,000					
HT	-0,302	-0,152	0,395	0,787**	-0,536*	1,000				
FDA	0,100	0,081	0,557*	0,450*	-0,272	0,728**	1,000			
MO	-0,397	-0,256	0,353	0,770**	-0,606*	0,975***	0,697*	1,000		
Hum	-0,257	-0,052	-0,357	0,428*	-0,756**	0,488*	-0,021	0,521*	1,000	
pH	0,235	0,108	-0,145	0,256	-0,586*	0,414*	0,191	0,376	0,691*	1,000

Tabla 15: Correlación entre cada par de variables

Matriz de correlación entre las diez variables (Celulolíticos – Cel, Amonificantes – Amo, Nitrificantes – Nit, Fijadores de N₂ de vida libre – Azo, Fijadores simbióticos de N₂ – Riz, Actividad enzimática global – FDA, Materia orgánica – MO, Humedad – Hum y pH). (*) indica correlaciones moderadamente altas, (**) indica correlaciones altas y (***) indica correlaciones muy altas.

DISCUSIÓN

La gran cantidad de microorganismos celulolíticos presentes en el monocultivo se debería al aporte de residuo vegetal con menor contenido de lignina de las malezas senescentes en el barbecho de soja, además de la presencia de un dosel abierto que permitiría una mayor temperatura del suelo (Frioni, 1999). Por el contrario, en la rotación agrícola, la menor presencia de celulolíticos se puede atribuir a que los residuos de trigo y maíz remanentes de los cultivos anteriores son más lignificados y con una mayor relación C/N, y a que hay escaso aporte de material senescente por parte del cultivo en crecimiento de trigo (Ernst *et al.*, 2002; Galarza *et al.*, 2011). En la clausura, la presencia de una cobertura vegetal más cerrada que generaría condiciones de menor temperatura, y el tipo de vegetación arbustiva perenne, sin grandes herbívoros ni laboreo que dañen esta vegetación, explican la menor abundancia de celulolíticos. Por último, en la pastura, hay mucha variabilidad entre las muestras, lo cual podría explicarse por la diferente intensidad de pastoreo en las distintas zonas del lote, que provocaría una diferencia en la cantidad de residuos celulósicos y en el aporte de nitrógeno. Los resultados pueden compararse con los obtenidos por Toresani *et al.*, (1998) en la Región Pampeana, quienes analizaron en postcosecha de trigo, en una rotación agrícola y con diferentes tipos de labranza, obteniendo densidades de celulolíticos de entre $1E^{+07}$ y $1E^{+10}$ siendo estos valores siempre superiores a los obtenidos en este trabajo. Esto sustentaría la idea de que el aporte de material vegetal senescente y la apertura de la cobertura vegetal, son factores que favorecen preponderantemente el desarrollo de estos microorganismos. A su vez, Varela *et al.* (2004), trabajando en suelos con diferentes usos en la zona cafetera colombiana, encontraron un aumento en la abundancia de bacterias celulolíticas en cafetales sin sombrío con respecto a bosques naturales y a cafetales con sombrío, lo cual asociaron a las condiciones de exposición a la luz que provoca un aumento de temperatura y a la presencia de fertilización nitrogenada, factores ambos que favorecen la degradación de la celulosa. Esto se condice con los resultados obtenidos en este trabajo.

Para el caso de los amonificantes, la ausencia de diferencias significativas en las cuatro situaciones, podría deberse a la gran versatilidad de este proceso microbiano que le permitiría a estos microorganismos desarrollarse con similar eficacia bajo la diversidad de condiciones presentes en los tratamientos.

Según Frioni (1999) en suelos con pH 5,12 hay poca cantidad de microorganismos nitrificantes y de acuerdo con Pozuelo González (1991) por debajo de pH 5 la nitrificación autótrofa (que es la evaluada en este experimento) desciende drásticamente. Aunque no hubo

correlación entre la abundancia de organismos nitrificantes y pH, esta última variable se mantuvo para todos los tratamientos en el rango de 5,16 a 5,60, lo cual explicaría que en general haya pocos microorganismos en las muestras. La mayor presencia de microorganismos nitrificantes en la pastura podría deberse al mayor aporte de materia orgánica nitrogenada, como las excretas del ganado y el material vegetal poco lignificado de la pastura implantada, a diferencia de lo que sucede en los otros tratamientos.

La menor presencia de *Azospirillum spp.* en el monocultivo de soja puede explicarse tanto por la ausencia continuada de gramíneas en el lote, como por el estado senescente de la escasa vegetación presente al momento de realizar el muestreo, por lo tanto el aporte de materia orgánica en forma de exudados radicales necesarios para el desarrollo de estas bacterias es muy bajo. En la rotación, a pesar de la presencia de gramíneas cultivadas, los valores son intermedios probablemente debido al ligeramente menor valor de pH y menor contenido de materia orgánica con respecto a la clausura y la pastura, variables con las que presenta distintos niveles de correlación positiva. En la pastura y en la clausura, la presencia de gramíneas perennes y la cobertura vegetal estable, con alto contenido de materia orgánica y mayor pH conforman un ambiente más favorable para el desarrollo de estos microorganismos (Caballero-Mellado, 2001). Esto puede compararse con un estudio llevado a cabo por Abril y González (1999) en bosque serrano chaqueño cordobés utilizado para ganadería, donde encontraron densidades de fijadores de N₂ de vida libre del orden de 1E⁺⁰⁹ a 1E⁺¹¹, los cuales están por encima de todos los valores encontrados en este trabajo. Esto sustenta el postulado de que la cobertura perenne y el mayor aporte de materia orgánica favorecen el desarrollo de este grupo de microorganismos.

La mayor abundancia de rizobios en los tres tratamientos cultivados con respecto a la Clausura se puede justificar a partir de la historia de los lotes. Tanto el monocultivo, como la rotación tuvieron repetidas siembras de soja con inoculación hasta el verano previo al muestreo inclusive, y la pastura tuvo una siembra de soja tres años y medio antes del muestreo. Diferentes experimentos tanto dentro (Brutti *et al.*, 1998; Sotelo *et al.*, 2010), como fuera de la Argentina (Croizat *et al.*, 1982), han demostrado la capacidad de los rizobios provenientes de inoculantes de soja de sobrevivir al menos cinco años en los suelos, aun en ausencia de su huésped. En cambio, en la clausura, no hubo cultivos de soja en los 32 años previos a la toma de muestras y las leguminosas se encuentran sólo esporádicamente representadas en su vegetación. Esto explicaría la escasa presencia de rizobios naturalizados en este suelo, los cuales podrían provenir de campos adyacentes por escorrentía superficial. En la pastura, a pesar de que el tiempo transcurrido desde la última siembra de soja es mayor que en la rotación y el

monocultivo, la abundancia comparable de rizobios podría justificarse por el gran aporte de materia orgánica de este tratamiento que les permitiría sobrevivir en vida libre.

Los microorganismos heterótrofos aerobios totales son un grupo inespecífico de microorganismos procariotas y eucariotas heterótrofos, aerobios y competitivos, que incluye, entre muchos otros, a todos los grupos funcionales evaluados, excepto los nitrificantes. Su mayor abundancia en la clausura y la pastura se explica por la fuente continua de materia orgánica lábil (variable con la cual muestra una correlación positiva muy alta), debida a la presencia de un estrato herbáceo perenne en ambos tratamientos. La abundancia de heterótrofos totales también se correlaciona positivamente con las variables contenido de humedad y pH, las cuales también contribuyen a un ambiente más propicio para los microorganismos al disminuir las condiciones de estrés en el suelo. En cambio, muestra correlaciones negativas con la abundancia de fijadores simbióticos y celulolíticos, lo cual posiblemente se deba a que estos grupos funcionales están más estimulados por la presencia del monocultivo de soja, a pesar de su menor aporte de materia orgánica. La mayor variedad de colonias observadas en la rotación con respecto al monocultivo, la cual puede considerarse como un indicador de mayor diversidad microbiana, podría deberse a la mayor heterogeneidad temporal de condiciones presentes en la rotación, a diferencia de la baja variabilidad de condiciones que caracteriza a un monocultivo (Sans, 2007), y también a condiciones inherentes a las diferentes rizosferas que caracterizan a estos cultivos.

La actividad enzimática global se correlaciona positivamente con el contenido de materia orgánica y con casi todos los grupos funcionales porque es impulsada por la actividad degradadora de la materia orgánica por los microorganismos (Schnürer y Rosswall, 1982). La existencia de una correlación negativa con los rizobios, y su respectiva correlación negativa con la materia orgánica, se debe a la repetida inoculación, que lleva a que estos microorganismos se encuentren en mayor proporción en aquellos tratamientos donde el aporte de materia orgánica es menor (Paredes, 2013). La mayor correlación se observa con la microflora total, dado que se trata de un grupo funcional muy amplio y diverso y degradador de la materia orgánica, que genera una gran actividad enzimática (Schnürer y Rosswall, 1982; Frioni, 1999). Los menores valores de actividad biológica en la clausura, contrario a lo esperado, podrían explicarse por la presencia de un estrato herbáceo alto de especies perennes, que a pesar de aportar una gran cantidad de materia orgánica al suelo y propender al mantenimiento de la humedad, crearía condiciones de baja temperatura ralentizando la actividad microbiana. En la pastura, en cambio, la presencia de leguminosas y de herbívoros genera un ambiente con alto aporte de nutrientes y mayor luminosidad. A su vez, la rotación y el monocultivo no presentan

diferencias significativas con la clausura y demuestran ser formas de manejo que también afectan negativamente a la actividad enzimática global, con respecto a la pastura. Esto se debe a que estas formas de manejo sustraen nutrientes, aportan escasa materia orgánica y dejan el suelo descubierto (Villar y Romero, 1999; Sawchik, 2001). El monocultivo tal vez tenga más actividad enzimática que la rotación por estar en estado de barbecho en el momento del muestreo, es decir que hay más aporte de material orgánico como rastrojo sobre el suelo que en el cultivo de trigo, donde el aporte más significativo es a través de los exudados radicales (Morón, 2001). Bortolato *et al.* (2013) midió la actividad enzimática global por el método de FDA en el sur de Santa Fe en el mes de noviembre de 2012, en lotes con diferentes esquemas de rotación, incluyendo monocultivo de soja, y con presencia o no de cobertura invernal. Este parámetro no fue sensible a los cambios debidos al esquema de rotación y los valores variaron entre 129 y 188 microgramos de Fluoresceína por gramo por hora, siendo comparables a los obtenidos en la pastura en este trabajo. Resultados similares fueron obtenidos por Sydorenko *et al.* (2013), quienes utilizaron este parámetro para comparar entre sistemas de labranza, fertilización fosforada y cultivo antecesor soja o maíz, en el oeste de la provincia de Buenos Aires. El muestreo se realizó postcosecha, en el mes de mayo, y pudieron detectar un aumento en la actividad enzimática global en lotes con siembra directa con cultivo antecesor soja y en todas las situaciones obtuvieron valores de entre 110 y 190 microgramos de Fluoresceína por gramo por hora, aproximadamente. Esto muestra que los valores obtenidos en este estudio tienden a ser bajos, salvo en el caso de la pastura, lo cual podría atribuirse al estado de la vegetación al momento del muestreo. En ambos trabajos se realizó el muestreo poco después de la cosecha, cuando hay un gran aporte de residuos vegetales al suelo, mientras que en este estudio, en la clausura y la rotación había una cobertura vegetal establecida y en el monocultivo había malezas senescentes, pero con poca biomasa y cobertura que aportaban poco material, aunque suficiente para ser significativamente superior en actividad enzimática que la rotación.

La temperatura mínima medida en el suelo en el año previo al muestreo fue de 1,1°C y la máxima de 41,0°C. Esto es adecuado para los microorganismos mesófilos, que son los que caracterizan a estos ambientes edáficos en zonas templadas, tanto en verano como en invierno (Frioni, 1999). Sin embargo, no existe certeza respecto a las posibles diferencias de temperatura debidas a microclimas asociados a cada tipo de ambiente, ya que no se evaluó diferencialmente este factor entre los tratamientos. Tampoco es posible inferir el efecto de las temperaturas extremas del año 2014 en las variables estudiadas, por tratarse de un experimento que no contempla la escala temporal, aunque es posible que los resultados obtenidos hayan sido afectados por estas condiciones anómalas.

En cuanto al contenido de materia orgánica, los valores obtenidos superan en todos los tratamientos el valor de 3,0% que representa el percentil 75 informado para la provincia de Santa Fe y en la pastura se encuentran cerca del máximo provincial. A su vez, tanto en la clausura, como en la pastura se supera el valor promedio para situaciones prístinas del sur de la provincia, mientras que la rotación y el monocultivo se encuentran por debajo de este valor, pero por encima del promedio general para esta zona (Sainz Rozas *et al.*, 2011). Los altos valores generales de materia orgánica en la rotación y el monocultivo probablemente se deban a la utilización de siembra directa complementada con fertilización, prácticas a las cuales se les atribuye la capacidad de reducir las pérdidas y aumentar las entradas de materia orgánica al suelo, respectivamente (Sainz Rozas *et al.*, 2011). Hubiera sido de esperar que la rotación presentara valores superiores con respecto al monocultivo de soja, por la presencia de gramíneas, pero esto no ocurre probablemente debido a la presencia de cobertura invernal de malezas en el monocultivo (Ferrerías *et al.*, 2012 y Bortolato *et al.*, 2013). En el caso de la clausura, los valores intermedios en contenido de materia orgánica pueden atribuirse a la presencia de un estrato herbáceo alto de especies perennes, que aporta una gran cantidad de residuos orgánicos al suelo y mantendría alta la humedad, aunque también provoca condiciones de baja luminosidad y, potencialmente, temperatura en la superficie del suelo, lo que retrasaría la descomposición, causando una acumulación de material vegetal sobre el suelo que se convierte en materia orgánica lentamente. Por último, en la pastura, la presencia de leguminosas y herbívoros genera un ambiente de muy alto aporte de residuos orgánicos nitrogenados, con un dosel abierto que aumentaría la temperatura y la aireación, lo cual promueve la actividad degradadora. La correlación positiva con la actividad enzimática, heterótrofos totales y *Azospirillum spp.* se deben a los efectos benéficos de la materia orgánica sobre el suelo al ayudar a conservar la humedad, promover la actividad microbiana y aumentar la presencia de microorganismos degradadores generalistas (Pozuelo González, 1991).

La intención original de la obtención de datos de humedad de suelo fue la de contar con un coeficiente para corregir variables edáficas y microbiológicas relacionándolas con peso de suelo seco, motivo por el cual se los expresa como factor humedad y no gravimétrica o volumétricamente. De este modo, no es estrictamente correcto considerar valores de humedad provenientes de un muestreo puntual como representativos del comportamiento hídrico del suelo. Sin embargo, se optó por incluir al contenido de humedad dentro de las variables a modo orientativo, ya que presentó valores significativos coherentes con lo esperable en función de los diferentes manejos en los lotes. En ese sentido, no debe atribuirse significado a los resultados numéricos en sí mismos, sino a las diferencias estadísticamente significativas existentes en el

contenido de humedad para las cuatro situaciones. De todas maneras, no se debe adjudicar a las ideas devenidas de estos resultados mayor veracidad que la de hipótesis no puestas a prueba. El mayor contenido de humedad en la clausura podría deberse al mantenimiento de una vegetación natural, perenne y variada, cuyos sistemas radicales favorecen el desarrollo de una compleja y profunda red de macroporos. Además esta vegetación promueve la presencia de un grueso mantillo de residuos vegetales, que contribuye, junto con la vegetación misma, al sombreado, a la protección contra el viento y la lluvia, a la retención de la humedad del aire, al frenado de la escorrentía y al mantenimiento de la fauna edáfica (FAO y UNESCO, 2006). La exclusión de grandes animales o maquinaria de la clausura, eliminaría completamente la posibilidad de compactación (Benites Jump y Castellanos, 2013). Además tiene un mayor contenido de materia orgánica que los manejos agrícolas. El menor contenido de humedad en la pastura, comparable al de los lotes agrícolas, podría atribuirse a una combinación del efecto del pisoteo del ganado y el sobrepastoreo, los cuales provocarían compactación y la presencia de parches de suelo desnudo, que contrarrestarían el efecto favorable de la vegetación perenne y el elevado contenido de materia orgánica de este tratamiento (FAO y UNESCO, 2006). La rotación obtuvo valores de humedad menores, aunque cercanos a los del monocultivo. Esto podría deberse a los efectos de la compactación por el mayor tránsito de maquinaria agrícola asociado a la presencia de dos cultivos en el año, a pesar de que la rotación conlleva mayor complejidad del espacio poroso y mayor sombreado (Duval *et al.*, 2015). También podría estar influyendo el bajo contenido de materia orgánica que disminuye la estabilidad de la estructura (Pozuelo González, 1991). En ambos manejos agrícolas, la ausencia de labranzas, la fertilización y el mantenimiento de cierta cobertura durante todo el año, posiblemente amortigüen hasta cierto punto los efectos de la degradación física del suelo, evitando que la misma alcance valores extremos (Ferrerías *et al.*, 2012). De haber compactación, la misma podría deberse a la magnitud de las precipitaciones del primer trimestre del año, que llevaron a condiciones de excesiva humedad.

Los valores de pH en todos los tratamientos se encontraron por debajo del valor de 5,80, que representa el percentil 25 para la provincia de Santa Fe, e incluso se ubicaron por debajo del rango de pH anormalmente bajo informado para el sur de esta provincia por Sainz Rozas *et al.* (2011), atribuidos al manejo agrícola. El nivel de pH ligeramente menor en la rotación posiblemente se deba a la presencia de mayor cantidad de cultivos por año y mayor proporción de monocotiledóneas, lo cual aumentaría la remoción de bases, mientras que por la menor proporción de leguminosas, es necesaria una mayor fertilización nitrogenada. Por otro lado, la pastura debería su acidez probablemente al aporte de orina del ganado, mientras que la clausura

podría deber estos valores al gran aporte de material vegetal y las condiciones de lenta descomposición, que causa acumulación de materia orgánica, provocando un aumento de la capacidad de intercambio catiónico (Sainz Rozas *et al.*, 2011). Las leves diferencias observadas con respecto al pH para los cuatro tratamientos no parecieran haber tenido una influencia observable sobre los parámetros biológicos evaluados.

La diferenciación entre los tratamientos, observada en el PerMANOVA y el CAP, confirma que el manejo tiene un impacto verificable sobre características microbiológicas y físico-químicas del suelo (Montecchia *et al.*, 2011). La ausencia de diferenciación entre las dos situaciones agrícolas (monocultivo y rotación), estaría indicando que, en cuanto a las propiedades evaluadas, estos dos manejos producen impactos similares, y por lo tanto probablemente sea similar también el efecto sobre la salud del suelo y la sustentabilidad del sistema agroecológico (Cerón Rincón y Melgarejo Muñoz, 2005). Por otro lado, es la pastura, más que la clausura, la que presenta mayor contraste con los escenarios agrícolas. Esto probablemente se deba al efecto del ganado, que está excluido de las otras tres situaciones, y que, por un lado, realiza un importante aporte de materia orgánica rica en nitrógeno y de rápida descomposición, y por el otro, realiza un permanente disturbio al suelo, mediante el pisoteo y la herbivoría (Grime, 1979).

Las situaciones de manejo seleccionadas en este trabajo representan esquemas de rotación contrastantes, con la salvedad de que, por llevarse a cabo dentro del campo experimental de una Facultad de Ciencias Agrarias, se trata de situaciones ideales respecto al manejo, ya que se utiliza la siembra directa, la aplicación no excesiva de agroquímicos, fertilización, fechas idóneas de siembra y cosecha, rotación del ganado mediante boyeros eléctricos, etc., en suma, buenas prácticas agrícolas en general (Benites Jump y Castellanos, 2013).

La bibliografía permite suponer que, entre las diferentes situaciones de cultivo, la pastura será más sustentable, luego la rotación y por último el monocultivo. Para el caso de los esquemas netamente agrícolas, se suele afirmar que un esquema de rotación agrícola con alternancia de soja con gramíneas como el maíz, que deja gran volumen de residuos de baja calidad, presentará mejores condiciones de suelo que un monocultivo de soja (Villar y Romero, 1999; Sawchik, 2001; Abril *et al.*, 2005; FAO y UNESCO, 2006; Sans, 2007, Ferreras *et al.*, 2012). Sin embargo, en los lotes evaluados, ambos tratamientos sólo presentan diferencias significativas en las variables abundancia de celulolíticos, actividad enzimática global y pH, siendo las tres mayores en el monocultivo, probablemente por encontrarse en situación de barbecho con vegetación senescente. Estas diferencias no bastan para que ambos tratamientos

se segreguen en los análisis multivariados. Por lo tanto, estos resultados coinciden con lo observado por otros autores, en el sentido que, independientemente del esquema de rotación, la agricultura continua presenta un impacto similar y negativo en las propiedades del suelo (Bortolato *et al.*, 2013; Duval *et al.*, 2015). Esto posiblemente se deba a la buena calidad del manejo agrícola del monocultivo, que al incorporar la siembra directa y dejar cobertura durante el invierno, aminora los impactos negativos que suelen asociarse a este esquema (Benites Jump y Castellanos, 2013). La presencia de cobertura vegetal durante el invierno explica los valores comparables en contenido de materia orgánica, pH, actividad biológica, y abundancia de distintos grupos funcionales, como heterótrofos totales, celulolíticos y rizobios (Pozuelo González, 1991). La siembra directa y la adecuada fertilización explican también la abundancia relativa de materia orgánica con respecto a la rotación agrícola (Sawchik, 2001). Las ventajas que presenta la rotación, en cuanto a heterogeneidad de sistemas radicales y residuos vegetales, además de una cobertura permanente, se ve contrarrestada por los efectos de la compactación y remoción de bases debido a la presencia de mayor cantidad de cultivos por año (Sainz Rozas *et al.*, 2011; Duval *et al.*, 2015). Una de las ventajas de la rotación con respecto al monocultivo observadas en este trabajo fue la mayor heterogeneidad de colonias de heterótrofos totales. Esto refleja una mayor diversidad específica de microorganismos, que posiblemente se relacionen con una mayor sustentabilidad del sistema edáfico. La menor diversidad específica del monocultivo podría darse debido a las condiciones de homogeneidad temporal y unidireccionalidad del disturbio respecto a la especie cultivada y a los agroquímicos aplicados (Sans, 2007). Esto lleva a un sistema muy simplificado que termina seleccionando especies resistentes a este disturbio, modelando las comunidades de microorganismos, así como las de malezas (Zabaloy *et al.*, 2012).

Si bien la clausura se encuentra en estado estable, ya que no ha habido disturbios antrópicos por más de 30 años, no es exactamente una situación prístina (Boccanelli *et al.*, 2010). La vegetación es cerrada y semileñosa, y hay un abundante mantillo, que generaría una situación de baja temperatura, lenta degradación y alta humedad, con predominio de la humificación sobre la mineralización de la materia orgánica, lo que permite la conservación del suelo superficial. Por estos motivos, se la puede tomar como una situación de referencia y se encuentra que se diferencia de los tratamientos agrícolas principalmente por la ausencia de rizobios, mayor contenido de materia orgánica, mayor abundancia de heterótrofos totales y mayores valores puntuales de humedad.

La pastura se aproximaría más a una situación conservada que los cultivos agrícolas (Sainz Rozas *et al.*, 2011) y tiene en común con la clausura la presencia de vegetación perenne

y heterogénea, que trae como consecuencia el mayor contenido de materia orgánica y abundancia de *Azospirillum spp.* y heterótrofos totales que las distingue de la agricultura continua. Sin embargo, estas situaciones se diferencian entre sí, fundamentalmente por la presencia de leguminosas y grandes herbívoros en la pastura, que generan un enorme aporte de materia orgánica rica en nitrógeno, lo cual lleva a una mayor nitrificación y mayor contenido de materia orgánica (Pozuelo González, 1991). Por otro lado, el transcurrir y alimentarse del ganado puede generar compactación y mantiene al agroecosistema en situación de constante disturbio (Grime, 1979; FAO y UNESCO, 2006). Esto se evidencia en la mayor actividad biológica y, en uno de los sectores que mostraba señales de sobrepastoreo, una abundancia de microorganismos celulolíticos comparable con la del monocultivo. El único punto en común entre la pastura y los tratamientos agrícolas, en cuanto a los resultados obtenidos, es la abundancia de fijadores simbióticos y tiene que ver con la siembra de soja dentro del esquema de rotación agrícola-ganadero (Paredes, 2013). El gran contenido de materia orgánica de la pastura, mayor aun que el de la clausura, no implica sin embargo, una situación de menor impacto o mayor salud o calidad de suelo. Al considerar “materia orgánica” a todo aquello que pasa por un tamiz de 2 mm (Anderson y Ingram, 1993; Morón, 2001), se está incluyendo y analizando en conjunto a materia orgánica de variada estabilidad. En la pastura, el mantenimiento de estos niveles elevados de materia orgánica depende del continuo aporte del ganado, ya que su mineralización es rápida (Pozuelo González, 1991). A su vez, el pastoreo impide el desarrollo de una mayor biomasa vegetal que aporte residuos de menor calidad que podrían contribuir a la neo-formación de suelo (Lewis, 2001; Abril *et al.*, 2005).

Las rotaciones agrícola-ganaderas suelen presentarse como la alternativa más sustentable, argumentando principalmente que se repone en los ciclos de pastura, la materia orgánica perdida durante la etapa agrícola (Sawchik, 2001). Es decir, la etapa de pasturas dentro del esquema de rotación, actúa como un repositor neto de materia orgánica, devolviendo al suelo condiciones cercanas a las naturales, que en este caso, podrían considerarse representadas por la clausura. Por el contrario, los ciclos agrícolas son un sustractor neto de materia orgánica. De este modo, podrían interpretarse las tres situaciones contrastantes (pastura, clausura y agricultura continua) como tres puntos representativos de una dinámica cíclica, con la clausura como estado medio, la agricultura como mínimo y la pastura como máximo en lo que respecta a las condiciones del suelo. Efectivamente, la pastura presenta valores altos en todas las variables evaluadas, excepto en humedad, lo cual no puede ser considerada estrictamente por tratarse de una medición puntual y no de un perfil representativo, aunque también podrían atribuirse sus valores a la posible presencia de compactación por una combinación de

anegamiento y presencia de ganado. Presenta abundancia de todos los grupos funcionales evaluados y de materia orgánica y consecuentemente, es alta su actividad enzimática. Por lo tanto, estos valores probablemente estén relacionados con una cuestión de escala temporal en donde, durante el esquema completo de rotación, los valores ciclan en torno a un punto de equilibrio. Si la rotación está bien diseñada, ese equilibrio debería parecerse a los valores característicos de situaciones naturales (Sawchik, 2001), en este trabajo, representadas por la clausura. Es importante tener en cuenta que este análisis constituye una fotografía instantánea de un proceso dinámico y sumamente complejo.

En cuanto a la hipótesis planteada originalmente en este trabajo, de que “los cambios en la composición y cuantificación de las poblaciones microbianas son indicadores del deterioro de las propiedades edáficas como consecuencia del manejo”, podemos afirmar que cada uno de los grupos funcionales evaluados varió de manera diferente entre los tratamientos. El deterioro en las condiciones edáficas, que se evidenció en el menor contenido de materia orgánica, se correlacionó con la abundancia de fijadores de vida libre y heterótrofos aerobios totales que, por lo tanto, podrían ser buenos indicadores de situaciones de impacto. La humedad también mostró un comportamiento similar al de estas variables, y es de suponer que la misma sería un buen indicador de salud o calidad del suelo, pero para ello sería necesario contar con valores representativos del contenido de humedad en el tiempo, ya que los datos puntuales de humedad con los que se cuenta en este trabajo no tienen valor como indicador. Los fijadores simbióticos de nitrógeno, a su vez, muestran una correlación negativa importante con las variables anteriormente mencionadas, sin embargo, en sí mismo, este grupo funcional no refleja los impactos negativos de la actividad agrícola, sino la mera presencia de la actividad asociada a la inoculación, independientemente de las potenciales consecuencias de la naturalización de los rizobios sobre la comunidad microbiana y la calidad y salud de los suelos (Paredes, 2013). Los celulolíticos son un buen indicador de disturbio, ya que su abundancia se relaciona con la presencia de material vegetal en descomposición, pero estos disturbios pueden ser antrópicos o naturales y no necesariamente se relacionan con un deterioro de las propiedades edáficas (Frioni, 1999). No pareciera ser un buen indicador de la salud del suelo, al menos si su utilización es estática como en este caso, ya que posiblemente, sus niveles medios a lo largo del año sean muy diferentes de lo observado en este trabajo. Asimismo, la abundancia de microorganismos nitrificantes que necesitan amonio como sustrato, se relaciona con el aporte de materia orgánica que pueda ser rápidamente amonificada, lo cual puede ser evidencia de otro tipo de disturbios, pero no refleja por sí misma la salud del suelo (Frioni, 1999). La actividad enzimática global tiene un comportamiento similar y ambas parecieran relacionarse con una

situación de continuo disturbio. Los microorganismos amonificantes no mostraron variación entre estos tratamientos, ya sea porque no existe, o porque es muy dificultosa la técnica de medición, y no pareciera justificarse el uso de este grupo funcional como indicador de disturbios antrópicos en los suelos Pampeanos. Este no es el caso del pH, ya que aunque no representa demasiada variación entre los tratamientos, el nivel de acidez está demasiado alto en todos ellos, y efectivamente refleja el deterioro generalizado de la región ante el histórico disturbio agrícola por más de un siglo (Sainz Rozas *et al.*, 2011), que 30 años de clausura no logran revertir, probablemente además, porque la vegetación natural se ha perdido (Boccanelli *et al.*, 2010).

Aunque la abundancia de los microorganismos pertenecientes a cada grupo funcional no reflejan por sí misma la ausencia de disturbios, ni salud o calidad del suelo, el análisis de diversos indicadores de este tipo en conjunto con otros microbiológicos, como la actividad enzimática global, y físico-químicos, permitió extraer importantes conclusiones respecto al impacto de las distintas formas de manejo sobre los suelos de la Región Pampeana. De este modo se puede afirmar que los cambios en un conjunto de diversos indicadores microbiológicos funcionales y físico-químicos edáficos, relacionados entre sí de manera uni y multivariada, permiten evaluar el deterioro de las propiedades edáficas ante el disturbio de la agricultura.

CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron indicadores de variada naturaleza para estudiar los efectos sobre el suelo del disturbio agrícola en la Región Pampeana:

- Se pudo comprobar que los diversos indicadores, tomados individualmente, presentaban un comportamiento particular que respondía a propiedades específicas. En el caso concreto de los grupos funcionales, es importante tener en cuenta que condiciones favorables para un grupo determinado no necesariamente implican condiciones favorables para la comunidad microbiana en general, ni el mantenimiento de las funciones ecológicas. Dentro de los grupos funcionales evaluados, Celulolíticos se encontró en mayor proporción en el monocultivo, Fijadores simbióticos de N₂ en la rotación, Nitrificantes en la pastura, Fijadores de N₂ de vida libre y Heterótrofos aerobios totales en la pastura y la clausura, y amonificantes no varió entre los ambientes.

- A partir de su comparación con el resto de las variables, se puede afirmar que Fijadores de N₂ de vida libre, Heterótrofos aerobios totales y Contenido de materia orgánica, son quienes mejor caracterizaron a los ambientes de mayor sustentabilidad, la rotación agrícola-ganadera y la clausura, siendo estas tres variables las que mejor se correlacionaron entre sí. A su vez, la actividad enzimática global y el pH, brindaron valiosísima información que permitió poner en contexto a las demás variables y explicarlas, mientras que la humedad podría haberse utilizado de igual manera de haberse medido un indicador representativo. Por el contrario, los demás grupos parecieran haber variado en función de otras características del ambiente que no necesariamente se asocian al disturbio antrópico.

- En general, se puede decir que la utilización conjunta de diversos tipos de indicadores biológicos, físicos y químicos, es un buen abordaje para tener una idea más completa del estado de los agroecosistemas.

En cuanto al manejo, se comprobó que el mismo tiene un impacto observable sobre propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y estas permitieron extraer algunas importantes conclusiones:

- Existe un deterioro generalizado de las condiciones edáficas en la región, reflejado en el proceso de acidificación, donde los valores encontrados de pH en todos los tratamientos fueron llamativamente bajos. Esta situación se presenta incluso en la clausura, constituyéndose en otra evidencia de que ciertos impactos del continuado manejo agrícola por más de un siglo en la región, no se revierten en 30 años.

- No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos agrícolas (monocultivo y rotación agrícola), probablemente debido a las buenas prácticas agrícolas que se dan en el marco de la situación analizada. Ambos mostraron tener mayor impacto según las variables analizadas que los otros dos tratamientos (rotación agrícola ganadera y clausura), y sin embargo el impacto fue menor que lo esperado. Esto confirma que la agricultura continua es un manejo muy poco sustentable, particularmente para el suelo, y demuestra la importancia de llevar a cabo la actividad agrícola con el mayor refinamiento técnico posible.

- Se presume el efecto de las situaciones de anegamiento durante los meses anteriores al muestreo, que podrían llevar a la compactación de los ambientes más transitados, la rotación y la pastura. Es de vital importancia ajustar el manejo para poder adaptarlo en situaciones de contingencia y evitar daños al suelo, especialmente hoy en día que el cambio climático estaría llevando a un aumento de los fenómenos meteorológicos extremos.

- Se puso de manifiesto que la rotación agrícola-ganadera es la menos impactante sobre el sistema y se evidenció el papel de la pastura como etapa de reposición de nutrientes y materia orgánica al suelo. La incorporación de ciclos de pastura a las rotaciones, en esquemas especialmente diseñados para cada sitio, sería una manera adecuada de abordar la problemática del deterioro de los suelos pampeanos y tender a la sustentabilidad del sistema productivo.

- Los resultados demuestran la importancia que tiene el manejo sobre la comunidad microbiana del suelo y, en consecuencia, sobre la recirculación de los nutrientes en los ecosistemas y el mantenimiento de la salud del ambiente.

No obstante la importante información generada por este trabajo, es indudable que la misma podría verse enriquecida por diferentes estrategias que permitieran ampliarla o complementarla. En este sentido, hay algunos aspectos de gran relevancia que no han sido tenidos en cuenta en este trabajo:

- Sería muy recomendable considerar la variación interestacional e interanual de los indicadores evaluados. Esto permitiría inferir el efecto de otras variables ambientales, como las condiciones meteorológicas, el estadio de la vegetación y la etapa dentro del esquema de rotación, para evaluar al sistema en su complejidad dinámica y diferenciar mejor los efectos de los disturbios antrópicos de los naturales.

- Sería pertinente realizar un seguimiento en el tiempo de los perfiles de humedad del suelo para obtener valores representativos de cada situación, que permitan constatar los efectos del manejo sobre esta variable y a su vez, evaluar su influencia en la microbiota del suelo.

- Sería interesante caracterizar los microclimas asociados a cada uno de los ambientes considerados, para profundizar el conocimiento de los mecanismos que relacionan al manejo con las comunidades edáficas.

- Sería relevante complementar a los indicadores utilizados en este trabajo con aquellos referidos a las condiciones netamente edáficas, como estructura, microrrelieve y fertilidad, para saber si están comprometidas estas propiedades y cómo se correlacionan con los resultados microbiológicos.

- Otro aspecto para considerar sería la diversidad específica de los microorganismos entre los diferentes tratamientos, que permitiría extraer más conclusiones acerca de la sustentabilidad de los sistemas.

- Sería interesante ampliar el espectro de condiciones de manejo, para saber de qué manera impacta cada una en el sistema edáfico.

- Aunque se sabe que los microorganismos evaluados a través del enfoque funcional son indicadores sensibles de situaciones de deterioro del suelo por manejo, no abundan los antecedentes de su uso en la Región Pampeana, con tratamientos similares a los seleccionados y con el objetivo de evaluar salud y sustentabilidad. En esta región se los ha utilizado mayoritariamente con el objetivo de evaluar calidad y productividad, y principalmente para evaluar los efectos de la siembra directa, habiendo además, gran heterogeneidad de indicadores seleccionados en distintos trabajos. Por estos motivos sería pertinente profundizar en la caracterización de indicadores fiables de deterioro en la salud del suelo, a causa del impacto de los manejos agrícolas más relevantes en la Región Pampeana.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril A, Acosta M, Oliva L, Bachmeier O. 1990. Dinámica estacional de la microflora en un Haplustol Típico de la región semiárida bajo diferentes manejos agrícolas. *Ciencia del Suelo* 8(1):31-39.
- Abril A, González C. 1999. Dinámica de la fertilidad y de las poblaciones microbianas en suelos afectados por incendios en las sierras de Córdoba (Argentina). *Agriscientia* 16:63-70.
- Abril A, Salas P, Lovera E, Kopp S, Casado-Murillo N. 2005. Efecto acumulativo de la siembra directa sobre algunas características del suelo en la región semiárida central de la Argentina. *Ci. Suelo (Argentina)* 23(2) 179-188.
- Alexander M. 1987. *Introducción a la Microbiología del suelo*. México, D.F. AGT Editor S.A. p. 491.
- Anderson JM, Ingram JSI. 1993. *Tropical Soil Biology and Fertility. A Handbook of Methods*. Wallingford, Oxon. CAB International. p. 240.
- Anderson M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46.
- Anderson M.J. 2004. CAP: a FORTRAN computer program for canonical analysis of principal coordinates. Department of Statistics, University of Auckland, New Zealand.
- Anderson T-H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98:285–293.
- Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx M-C, Wood M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1785–1792.
- Benites Jump JR, Castellanos A. 2013. Mejorando la humedad del suelo con agricultura de conservación. *LEISA Revista de Agroecología* 19(2):1-6.
- Boccanelli SI. 2004. Desarrollo de la sucesión secundaria luego del abandono de campos agrícolas en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina) (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Argentina.
- Boccanelli SI, Pire EF, Barberis IM, Lewis JP. 2009. Clausuras en la provincia de Santa Fe: herramientas para el estudio de la dinámica de la vegetación.
- <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/27/6AM27.htm> Acceso: 5 de mayo de 2014.

- Boccanelli S, Pire E, Lewis JP. 2010. Vegetation changes after 15 years of abandonment of crop fields in the Pampas Region (Argentina). *Cien. Inv. Agr.* 37(2):45-53.
- Boccanelli SI. 2011. Dinámica de la vegetación luego del abandono de campos agrícolas en el sur de la Provincia de Santa Fe (Argentina). *Phyton* 80:4-11.
- Bolsa de Comercio de Rosario. 2014a. Buenos rindes darían 2,4 millones t de trigo en zona núcleo. GEA - Guía Estratégica para el Agro. Seguimiento semanal de cultivos Zona Núcleo. Semana al 17 de octubre de 2014.
- http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/GEA_%20376_2014_10_17.pdf Acceso: 10 de agosto de 2015.
- Bolsa de Comercio de Rosario. 2014b. Soja 2013/2014: superó extremos y anomalías de un clima salvaje. GEA - Guía Estratégica para el Agro. Seguimiento semanal de cultivos Zona Núcleo. Semana al 22 de mayo de 2014.
- http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/GEA_%20355_2014_22_05.pdf Acceso: 10 de agosto de 2015
- Bortolato M, Schiavon ME, Romagnoli MV, Fernández E, Toresani S. 2013. Rotaciones y cultivos de cobertura: cambios en indicadores biológicos y químicos del suelo. *Jornadas Argentinas de Conservación de Suelos*. Buenos Aires.
- Brutti L, Rivero E, Pacheco Basurco JC, Nicolás M, Iriarte L, Abbiatid N, Ljunggren H, Martensson A. 1998. Persistence of *Bradyrhizobium japonicum* in arable soils of Argentina *Applied Soil Ecology* 10:87-94
- Burgos JJ. 1970. El clima de la región noreste de la República Argentina en relación con la vegetación natural y el suelo. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 11(Suplemento):37-101.
- Caballero-Mellado J. 2001. El género *Azospirillum*.
- <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/> Acceso: 11 de octubre de 2015.
- Cabrera AL. 1951. Notas sobre Compuestas de la América Austral. *Darwiniana* 9:363-386.
- Cabrera AL. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. Segunda Edición. En: Dimitri MJ (Ed.) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Buenos Aires. ACME. p. 85.
- Carreira D. 2011. Cuantificación de la materia orgánica del suelo. Método de Walkley & Black. *Jornadas de actualización: Gestión de la calidad en los laboratorios de análisis de suelos agropecuarios*. SAMLA- PROINSA. Rosario.

- Cassán F, Penna C, Creus C, Radovancich D, Monteleone E, García de Salamone I, Di Salvo L, Mentel I, García J, Mayans Pasarello MC, Lett L, Puente M, Correa O, Punschke Valerio K, Massa R, Catafesta M, Rossi A, Díaz M, Righes S, Carletti S, Rodríguez Cáceres E. 2013. Inoculantes formulados con *Azospirillum spp.* En: Albanesi AS, Benintende S, Cassán F, Peticari A (Eds.) Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. Buenos Aires. Asociación Argentina de Microbiología. p. 53.
- Cerón Rincón LE, Melgarejo Muñoz LM. 2005. Enzimas del suelo: Indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana* 10(1):5-18.
- Conti ME. 2004. Efecto del uso agrícola sobre suelos vertisólicos. *Revista Científica Agropecuaria* 8(1):31-36.
- Crozat Y, Cleyet-Marel JC, Giraud JJ, Obaton M. 1982. Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. *Soil Biol. Biochem* 14(4):401-405.
- De La Fuente E, Suárez S. 2008. Problemas ambientales asociados a la actividad humana: la agricultura. *Ecología Austral* 18:239-252.
- Derry AM, Staddon WJ, Kevan PG, Trevors JT. 1999. Functional diversity and community structure of micro-organisms in three arctic soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *Biodiversity and Conservation* 8:205-221.
- Doran J, Parkin TB. 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. En: Doran *et al.* (Eds.) *Methods for assessing soil quality*. Madison, WI. SSSA Special Publication. p. 25-37.
- Duval ME, Galantini JA, Martínez JM, López FM, Wall LG. 2015. Evaluación de la calidad física de los suelos de la región pampeana: efecto de las prácticas de manejo. *Ciencias Agronómicas* 25:33-43.
- Ernst O, Betancur O, Borges R. 2002. Descomposición de rastrojo de cultivos en siembra sin laboreo: trigo, maíz, soja y trigo después de maíz o de soja. *Agrociencia*. 6(1):20-26.
- Etchepare M, Boccanelli S. 2007. Análisis del banco de semillas y su relación con la vegetación emergente en una clausura de la llanura pampeana. *Ecología Austral* 17(1):159-166.
- Fernández E. 2006. Reacción del suelo. En: Cátedra de Edafología (Ed.) *Edafología*. Material de apoyo. Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

- Ferreras L, Magra G, Bessón P, Kovalevski E, García F. 2007. Indicadores de calidad física en suelos de la región Pampeana norte de Argentina bajo siembra directa. *Ci. Suelo (Argentina)* 25(2): 159-172.
- Ferreras L, Toresani S, Bonel B, Magra G, Romagnoli V, Canavese B, Fernández E, Beltrán C, Bortolato M. 2012. Sensibilidad de parámetros microbiológicos como indicadores de Calidad de Suelo: Experiencias en ensayos de Rotaciones y Labranzas.
<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/33/4AM33.html> Acceso: 27 de julio de 2016.
- Food and Agricultural Organization (FAO) and United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO). 2006. Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible. Manejo de la humedad del suelo.
http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/sm/soil_moisture.pdf
Acceso: 14 de abril de 2016.
- Frioni L. 1999. Procesos microbianos. Río Cuarto. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. p. 332.
- Frioni L. 2011. Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Buenos Aires. Orientación Gráfica Editora. p. 744.
- Gaitán Bohórquez DM, Pérez LI. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf> Acceso: 4 de junio de 2016.
- Galarza C, Vallone P, Gudelj V, Cazorla C, Baigorria T. 2011. Caracterización de rastrojos en sistemas agrícolas estabilizados. http://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-caracterizacin_de_rastrojos_en_sistemas_agrcolas.pdf Acceso: 28 de julio de 2016.
- Grime JP. 1979. Plant strategies and vegetation processes. Chichester. John Willey & Sons. p. 222.
- Grubb PJ. 1985. Plant populations and vegetation in relation to habitat, disturbance and competition: problems of generalizations. En: White J (Ed.) The population structure of vegetation. Dordrecht. Dr Junk. p. 595-621.
<http://rafaela.inta.gov.ar/anuario1999/p84.htm> . Acceso: 4 de febrero de 2016.

- Infobae. 2013. Advierten que la ola de calor es “la más extensa” registrada hasta el momento.
<http://www.infobae.com/2013/12/30/1534136-advierten-que-la-ola-calor-es-la-mas-extensa-registrada-el-momento> Acceso: 10 de agosto de 2015.
- IRAM-SAGyP 29571-2. 2011. Determinación de materia orgánica en suelos. Parte 2 - Determinación de carbono orgánico oxidable por mezcla oxidante fuerte, escala semi-micro.
- Lal R. 1999. Soil Quality and Soil Erosion. Soil and Water Conservation Society. Boca Raton. CRC Press. p. 329.
- Lawton J, Brown V. 1993. Redundancy in ecosystems. En: Shulze ED y Money H (Eds.) Biodiversity and Ecosystem Function. Berlin. Springer. p. 255-270.
- Lewis JP. 2001. La Biósfera y sus Ecosistemas. Una introducción a la Ecología. Rosario. Centro de Investigaciones en Biodiversidad y Ambiente. ECOSUR serie de publicaciones técnicas, N° 2. p. 209.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Décima Edición. España. Prentice. p. 1089.
- Mayfield MM, Bonser SP, Morgan JW, Aubin I, McNamara S, Vesik PA. 2010. What does species richness tell us about functional trait diversity? Predictions and evidence for responses of species and functional trait diversity to land-use change. *Global Ecol. Biogeogr.* 19:423–431.
- Mayz-Figueroa J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1):1-20.
- McCune B, Mefford MJ. 2011. PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6.0. Gleneden Beach, Oregon, U.S.A. MjM Software. p. 28.
- Montecchia MS, Correa OS, Soria MA, Frey SD, García AF, Garland JL. 2011. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology* 47:176–183.
- Morón A. 2001. El rol de los rastrojos en la fertilidad del suelo. En: Díaz Rossello R (Ed.) Siembra directa en el Cono Sur. Montevideo, Uruguay. PROCISUR. p. 387-405.
- Paredes MC. 2013. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf> Acceso: 11 de octubre de 2015.

- Pasotti P. 1981. Panorama general de la morfología de la llanura pampeana en un sector del territorio santafesino. GAEA, Serie Especial 9:39-58.
- Perticari A, Benintende S, Toresani S, Lett L, Cassán F, Albanesi A, González Fiqueni MF, Penna C, Rossi A. 2013. Evaluación de la actividad biológica de inoculantes formulados en base a rizobios en leguminosas método del promedio de plantas noduladas [ppn] o Burton modificado. En: Albanesi AS, Benintende S, Cassán F, Perticari A (Eds.) Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. Buenos Aires. Asociación Argentina de Microbiología. p. 53.
- Pillar VD, Orlóci L. 1996. On randomization testing in vegetation science: multifactor comparisons of relevé groups. *Journal of Vegetation Science* 7:585-592.
- Pozuelo González JM. 1991. Estudio de grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizosfera de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.
<http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/X/3/X3010001.pdf> Acceso: 4 de junio de 2016
- R Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
<http://www.r-project.org/> Acceso: 13 de abril de 2015.
- Ricotta C. 2005. A note on functional diversity measures. *Basic and Applied Ecology* 6:479—486.
- Sacchi O, Costanzo M, Coronel A. 2000. Características Climáticas de Zavalla. Informe interno de la cátedra de Climatología Agrícola. Fac. Cs. Agrarias, UNR. p. 11.
- Sainz Rozas H, Echeverría HE, Angelini H. 2011. Niveles de materia orgánica y pH en suelos agrícolas de la región Pampeana y extrapampeana argentina. *Ci Suelo* 29: 29-37.
- Sans FX. 2007. La diversidad de los agroecosistemas. *Ecosistemas* 16(1):44-49.
- Sawchik J. 2001. Dinámica del nitrógeno en la rotación cultivo - pastura bajo laboreo convencional y siembra directa.
<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219230807115519.pdf> Acceso: 28 de julio de 2016.
- Schmidt EL, Belser LW. 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. En: Bottomley PS, Angle JS, Weaver RW (Eds.) *Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*, SSSA Book Ser. 5.2. Madison, WI. SSSA. p. 159-177.

- Schnürer J, Rosswall T. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43(6):1256-1261.
- Soil Survey Staff. 2014. *Keys to Soil Taxonomy*. Twelfth Edition. Washington, DC. USDA-Natural Resources Conservation Service. p. 372.
- Sotelo CE, Leconte MC, Iglesias MC. 2010. Efecto de la inoculación al cultivo antecesor sobre la nodulación de la soja, en suelos de desmonte. *Agrotecnia* 20:13-17
- Staddon WJ, Duchesne LC, Trevors JT. 1997. Microbial diversity and community structure of postdisturbance forest soils as determined by sole-carbon-source utilization patterns. *Microb. Ecol.* 34:125–130.
- Sydorenko O, Villarroel Torrez D, Montecchia MS, Tosi M, Correa OS, Bordes G, Orłowski JF, Barraco M, Díaz-Zorita M, Soria MA. 2013. El cultivo y el tipo de labranza modulan la estructura y función de las comunidades microbianas de suelos del oeste de la provincia de Buenos Aires.
https://www.researchgate.net/publication/261437808_El_cultivo_y_el_tipo_de_labranza_modulan_la_estructura_y_funcion_de_las_comunidades_microbianas_de_suelos_d_el_oeste_de_la_provincia_de_Buenos_Aires Acceso: 23 de mayo de 2014.
- Tilman D, Lehman C, Thomson K. 1997. Plant diversity and productivity, theoretical considerations. *Proceedings of Natural Academy Science* 94:1857-1861.
- Toresani S, Gómez E, Bonel B, Bisaro V, Montico S. 1998. Cellulolytic population dynamics in a vertic soil under three tillage systems in the Humid Pampa of Argentina. *Soil & Tillage Research* 49:79-83.
- Toresani SMI, Gómez EV, Petenello MC, Romagnoli MV. 2011. Cátedra de Microbiología Agrícola. Guía de trabajos prácticos 2011. Zavalla. Facultad de Ciencias Agrarias – UNR. p. 234.
- Trevors J. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 101:45-67.
- Tricart J. 1973. Geomorfología de la Pampa Deprimida. Base para los estudios edafológicos y agronómicos. Buenos Aires. INTA Colección Científica N° XII. p. 202.
- Vallejo VE, Gómez MM, Cubillos AM, Roldán F. 2011. Efecto del uso de suelo sobre la densidad de bacterias nitrificantes y desnitrificantes en la Ecorregión Cafetera Colombiana. *Agronomía Colombiana* 29(3):455-463.
- Varela A, Aguilera MP, Vélez BE, Flórez C. 2004. Evaluación preliminar de grupos funcionales bacterianos como indicadores de calidad de suelos en zona cafetera.

https://www.researchgate.net/publication/228709784_EVALUACION_PRELIMINAR_DE_GRUPOS_FUNCIONALES_BACTERIANOS_COMO_INDICADORES_DE_CALIDAD_DE_SUELOS_EN_ZONA_CAFETERA Acceso: 25 de marzo de 2015.

Villar J, Romero L. 1999. Rotaciones agrícola-ganaderas para el centro de Santa Fe: respuesta de algunos parámetros de fertilidad del suelo y del rendimiento de grano de cultivos.

Wang ET, Martínez Romero J, López Lara I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas.

<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/> Acceso: 25 de febrero de 2016.

Zabaloy MC, Gómez E, Garland JL, Gómez MA. 2012. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. *Applied Soil Ecology* 61:333-339.

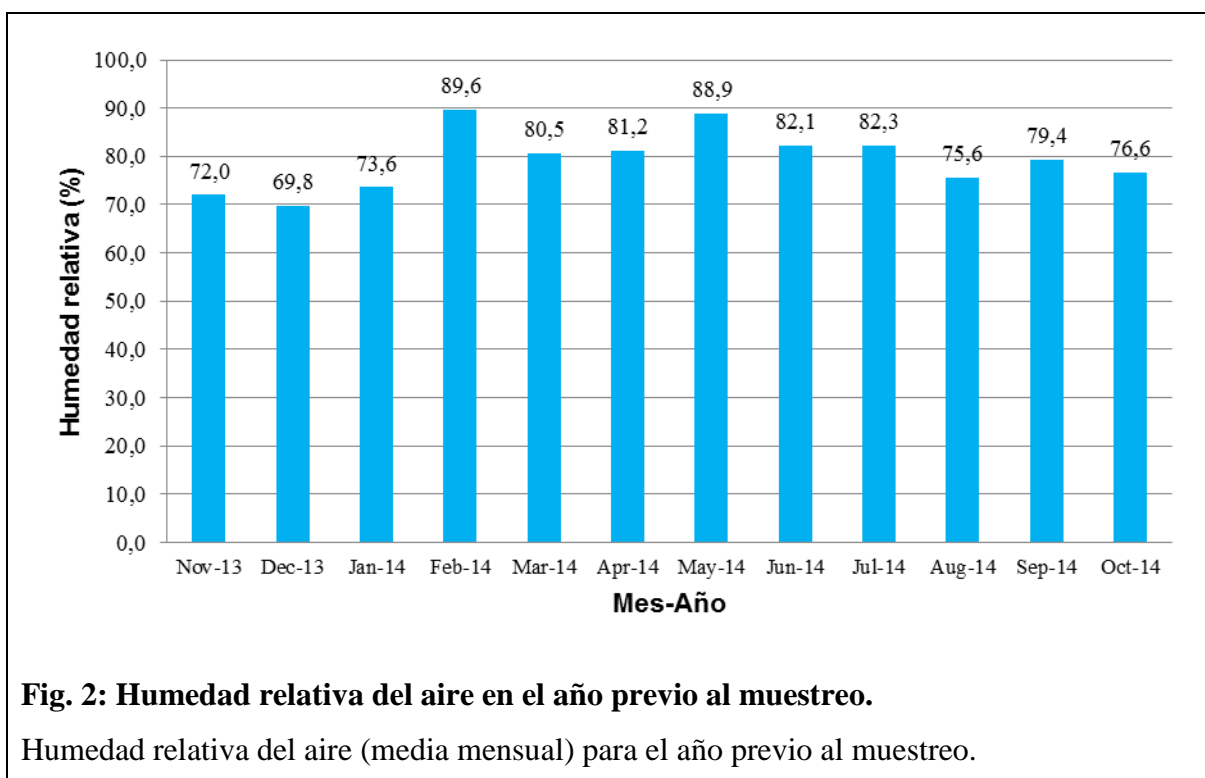
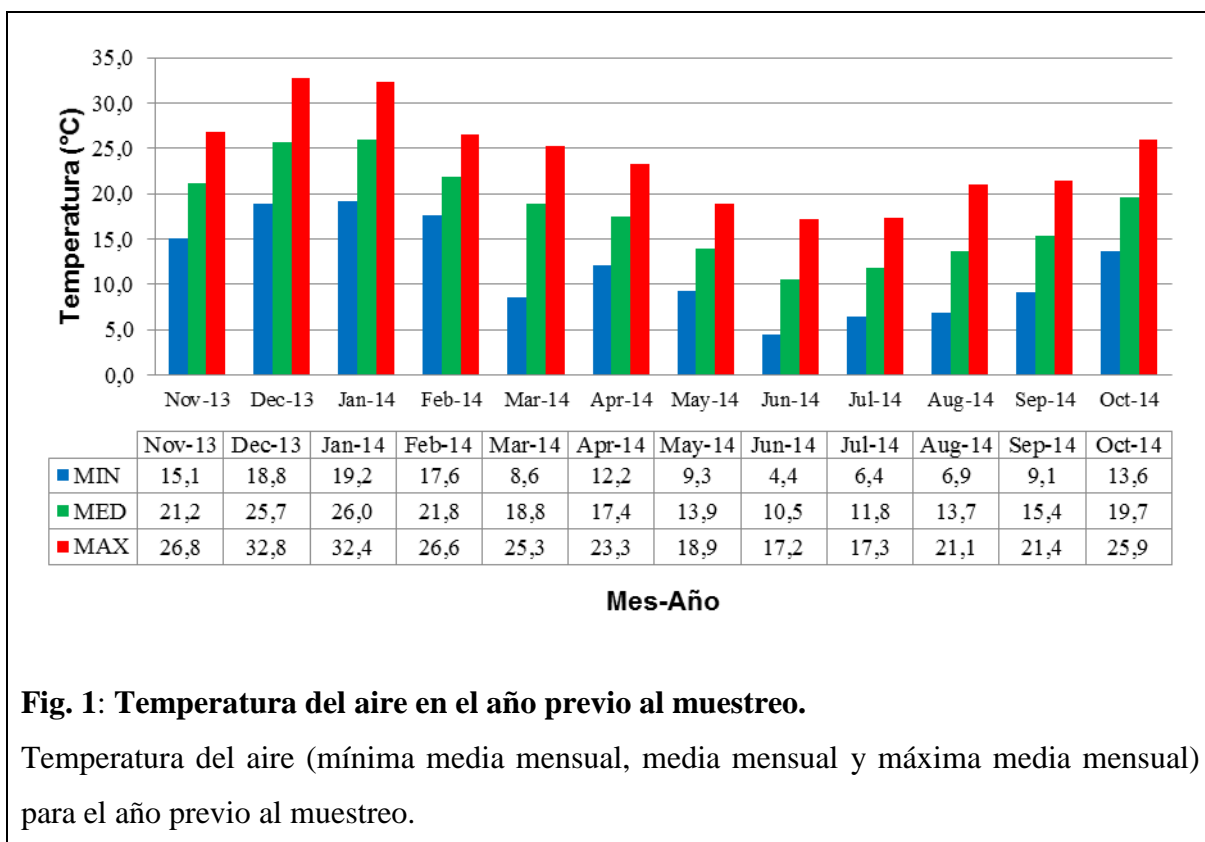
Zak J, Willing M, Moorhead D, Wildman H. 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1101-1108.

Zamora A, Malaver N, Ramos J. 2012. Análisis funcional de microorganismos: Un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biol. Venez.* 32(1):57-86.

Zar JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, New Jersey. Prentice Hall. p. 663.

ANEXO I: CONDICIONES METEOROLÓGICAS

Condiciones meteorológicas principales para el año previo a la toma de muestras.



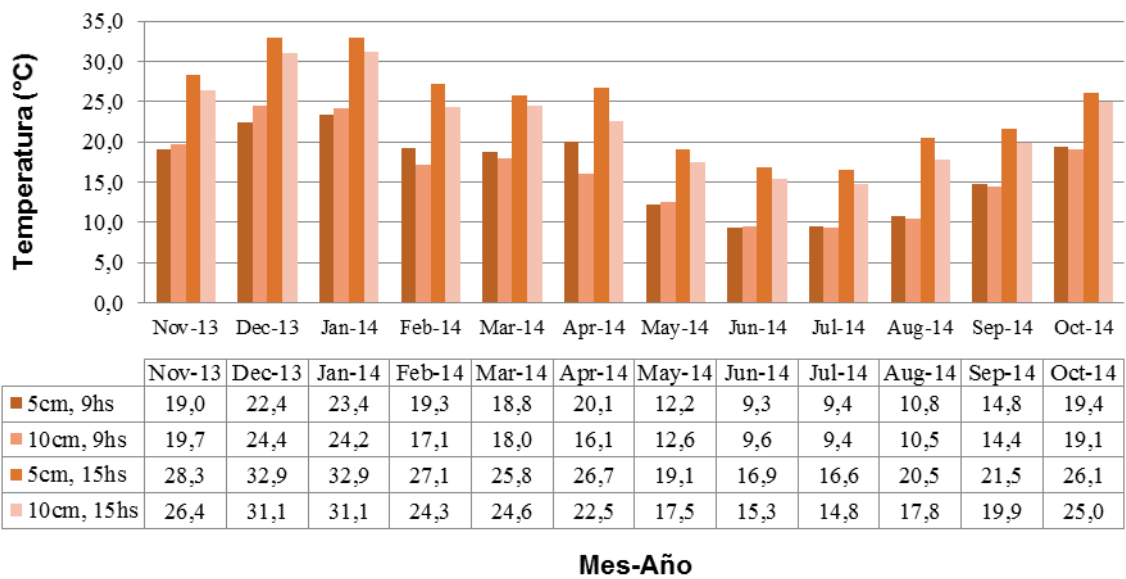


Fig. 3: Temperatura del suelo en el año previo al muestreo.

Temperatura del suelo media mensual (tomadas a las 9hs y a las 15hs a las profundidades de 5cm y 10 cm) para el año previo al muestreo.

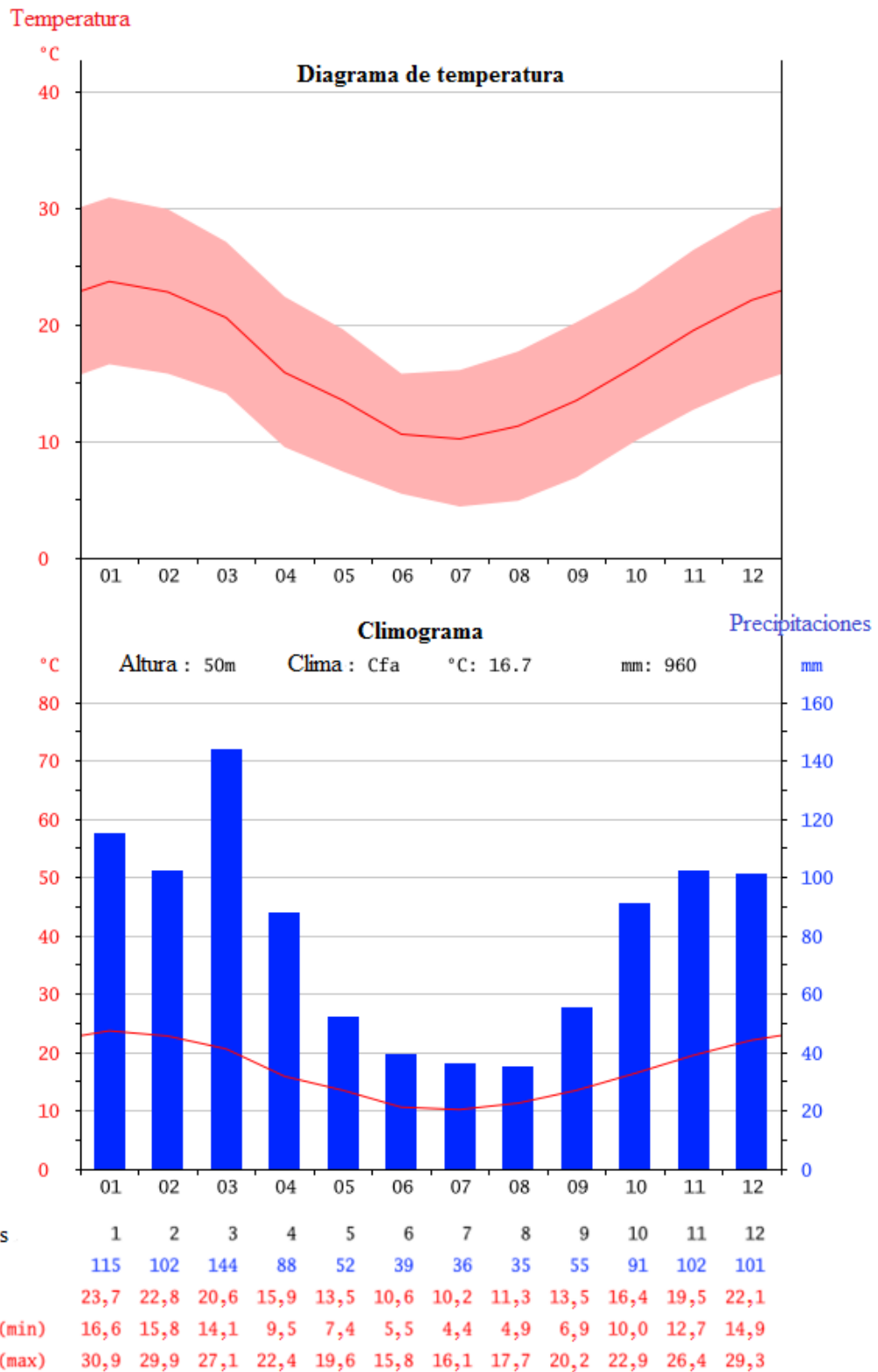


Fig. 4: Diagrama de temperatura y climograma de Zavalla.

Diagrama de temperatura y climograma para Zavalla que muestra temperatura del aire (mínima media mensual, media mensual y máxima media mensual) y precipitaciones acumuladas mensuales promediando mediciones entre 1982 y 2012. La clasificación climática Köppen-Geiger es “subtropical sin estación seca o pampeano” (Cfa). Tomada de Climate-data.org.

ANEXO II: FOTOGRAFÍAS

Fotografías correspondientes al desarrollo del trabajo de tesina.

Tratamientos:

(a)



(b)



(c)



(d) (e)



Fig. 1: Clausura.

Aspecto general de la Clausura con sus diferentes stands de vegetación. (a) Cardal de *Carduus acanthoides* L., (b) en primer plano, sorgal de *Sorghum halepense* (L.) Pers., por detrás chilcal de *Baccharis spp.* y (c) borde de la clausura. (d) Estrato herbáceo con *Adiantopsis chlorophylla* (Sw.) Fée. (e) Presencia de un mantillo de residuos vegetales de importante espesor. Tomadas el día del muestreo.

(a) (b)



Fig. 2: Rotación agrícola.

(a) Aspecto general de la rotación agrícola con un cultivo de trigo. (b) Presencia de residuos de cultivos predecesores, donde se distinguen claramente restos de maíz. Tomadas el día del muestreo.

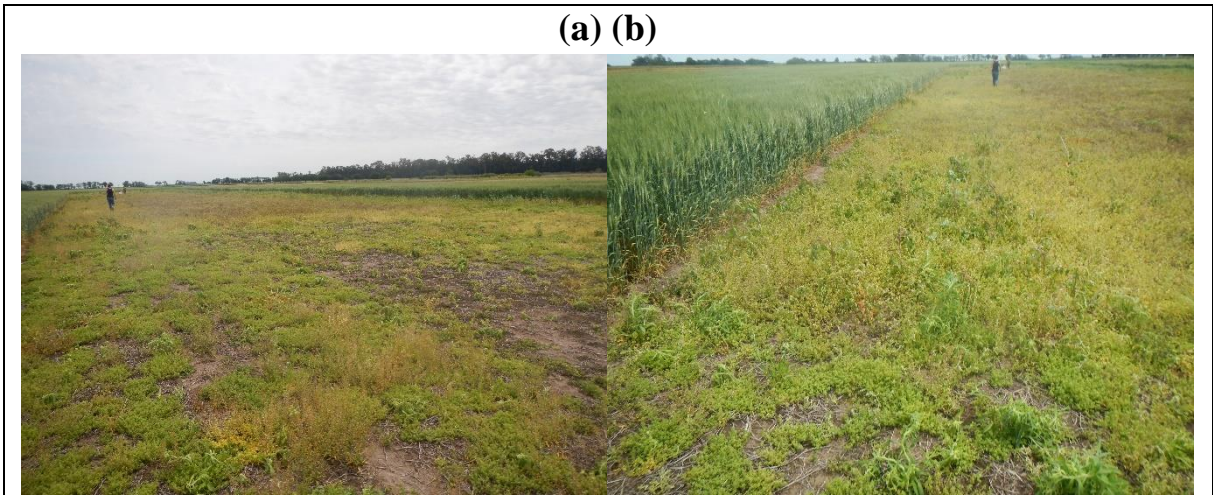
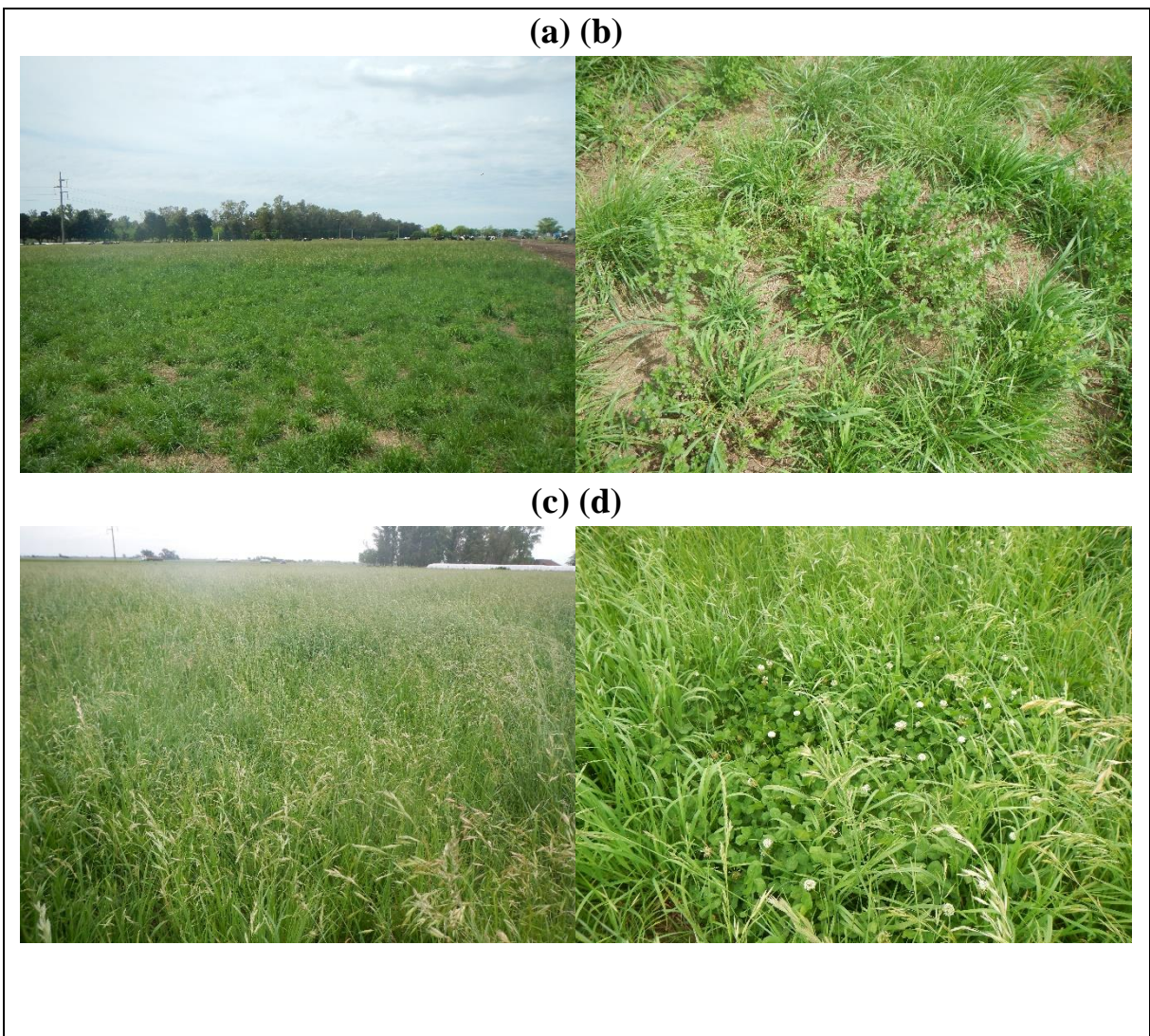


Fig. 3: Monocultivo de soja.

(a) y **(b)** Aspecto general del monocultivo de soja en barbecho con malezas en estado senescente. Puede observarse la presencia de sectores de suelo desnudo. Tomadas el día del muestreo.



(e) (f)



Fig. 4: Rotación agrícola-ganadera.

Aspecto general de la pastura. (a) y (b) Sector I, medianamente pastoreado. (c) y (d) Sector II, poco pastoreado. (e) y (f) Sector III, con señales de sobrepastoreo. Tomadas el día del muestreo.

Trabajo de laboratorio:

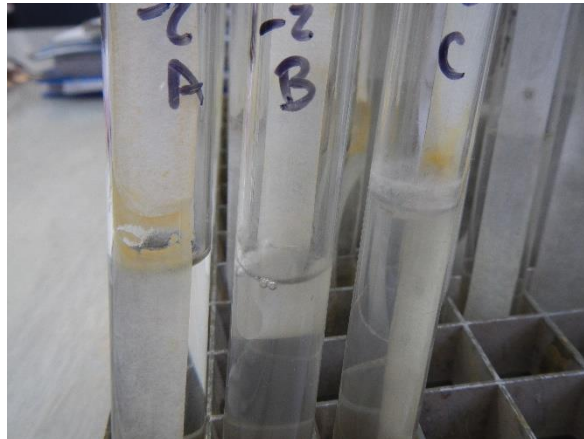


Fig. 5: Celulolíticos.

Tubos para recuento de celulolíticos donde se observa degradación microbiana en las tiras de papel.

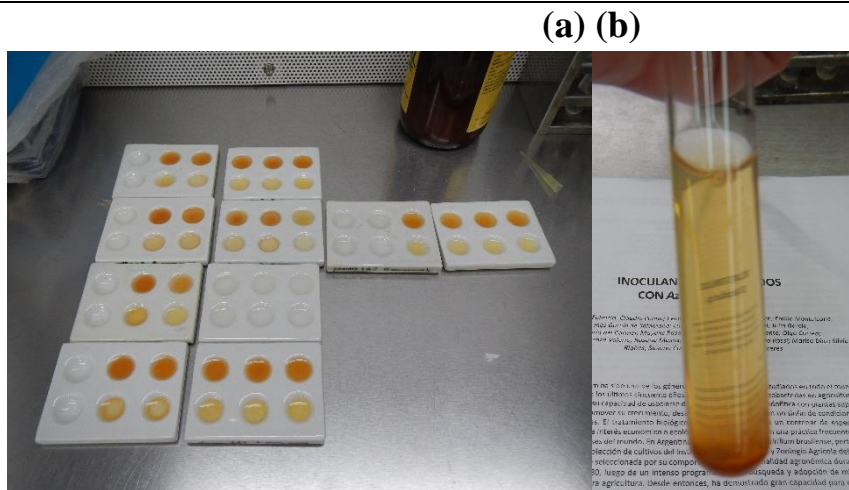


Fig. 6: Amonificantes.

Etapas sucesivas del recuento de amonificantes, **(a)** en piedras de toque y **(b)** en tubos.

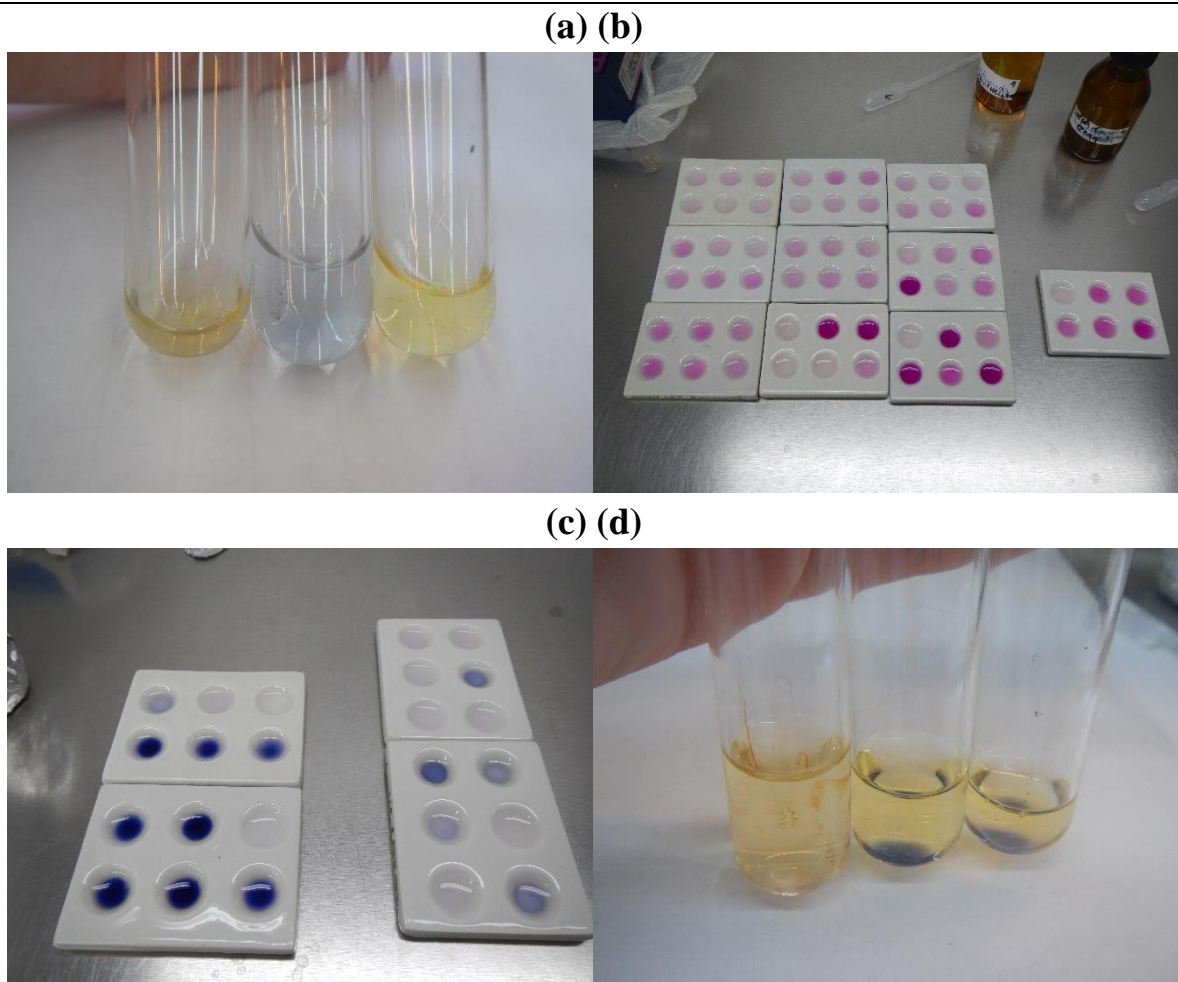
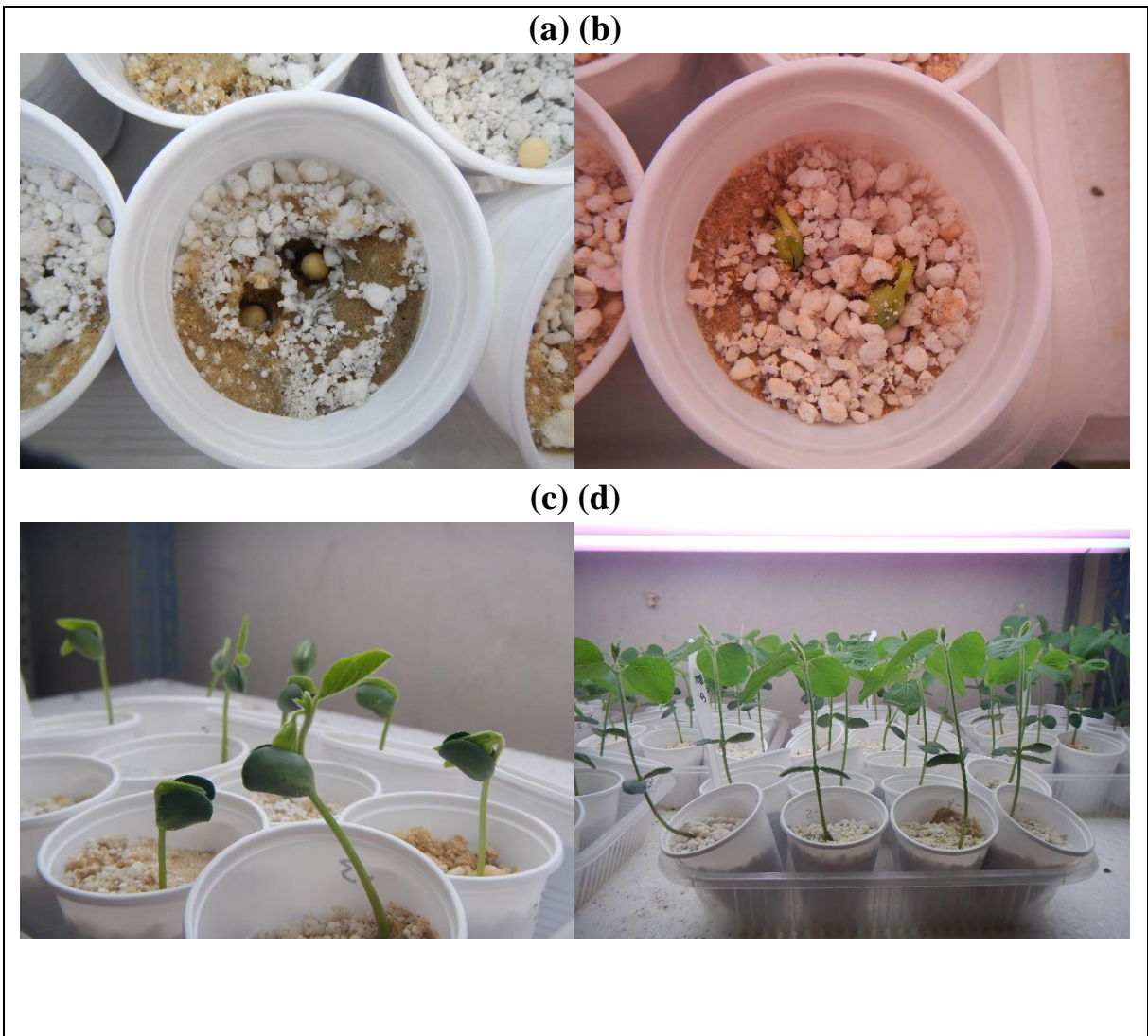
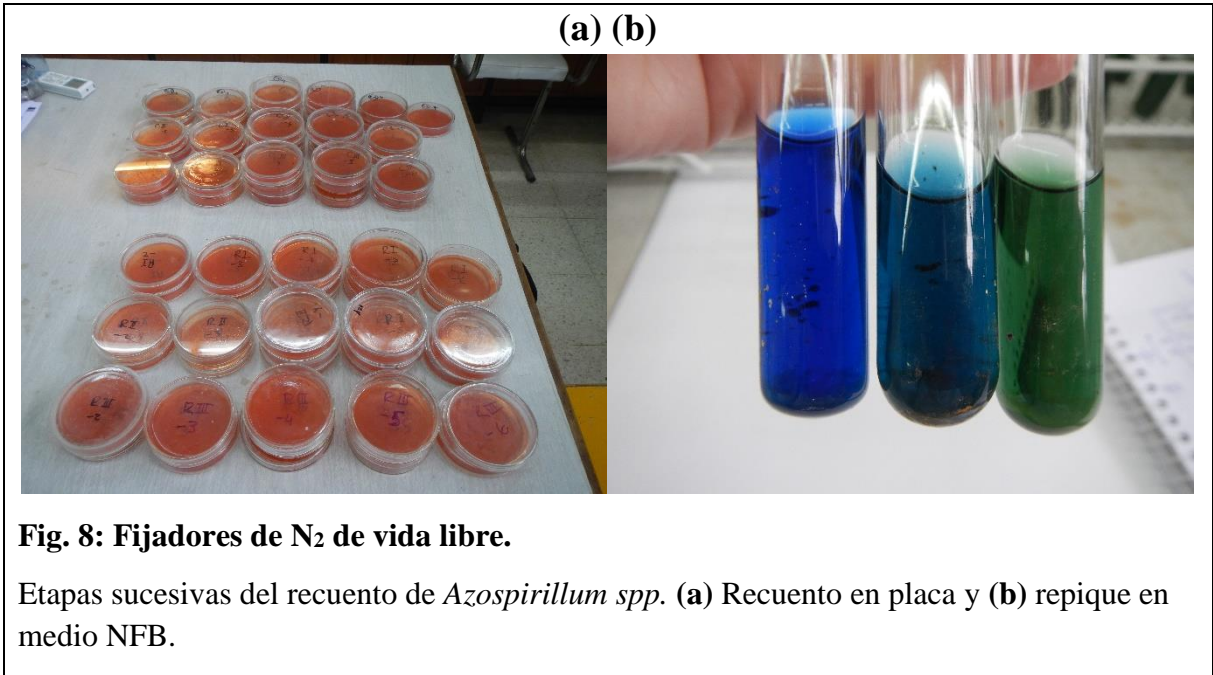


Fig. 7: Nitrificantes.

Etapas sucesivas del recuento de nitrificantes: **(a)** viraje del indicador de pH, **(b)** prueba de detección de nitrito, **(c)** y **(d)** prueba de detección de nitrato.



(e) (f)

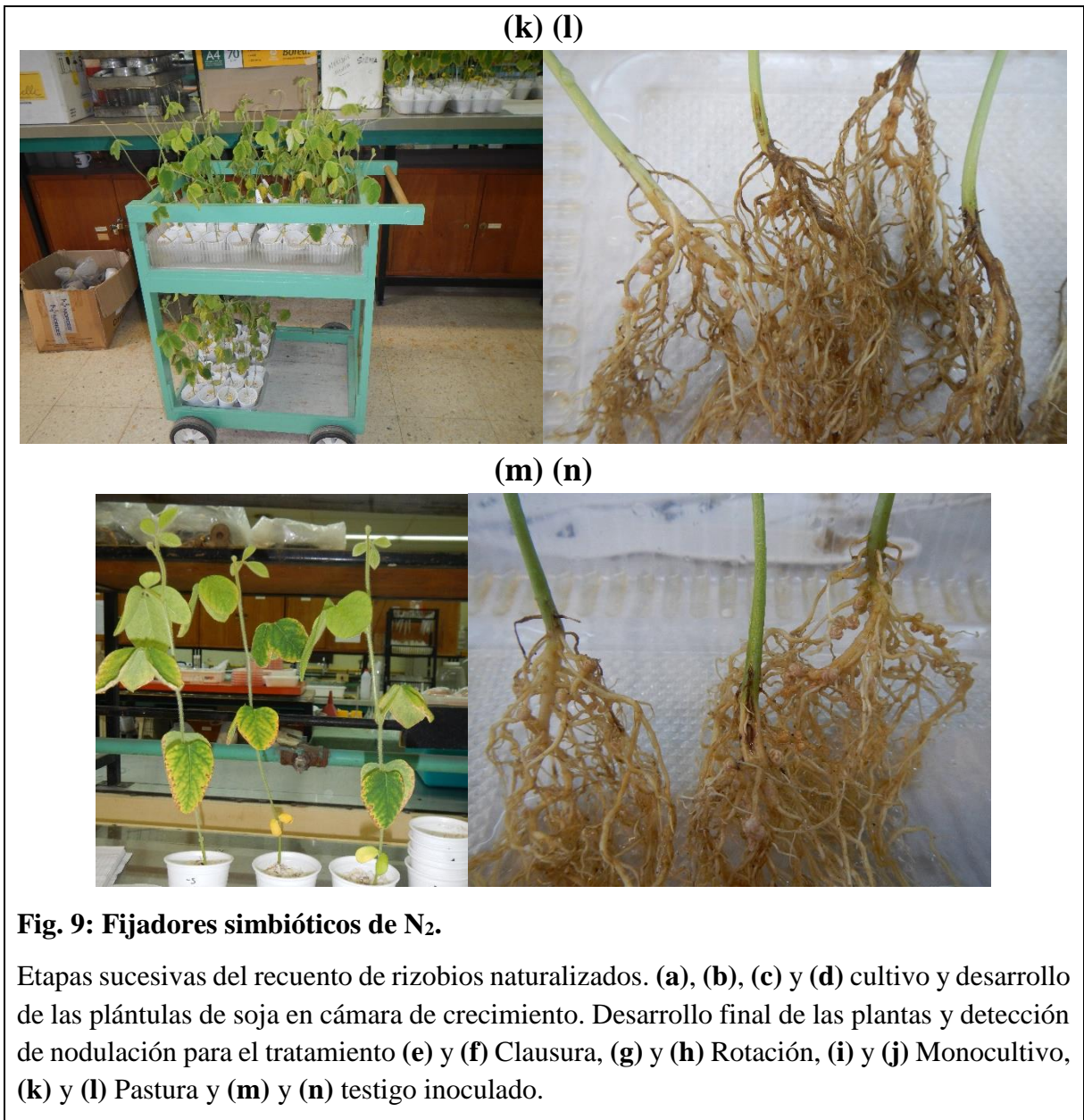


(g) (h)



(i) (j)





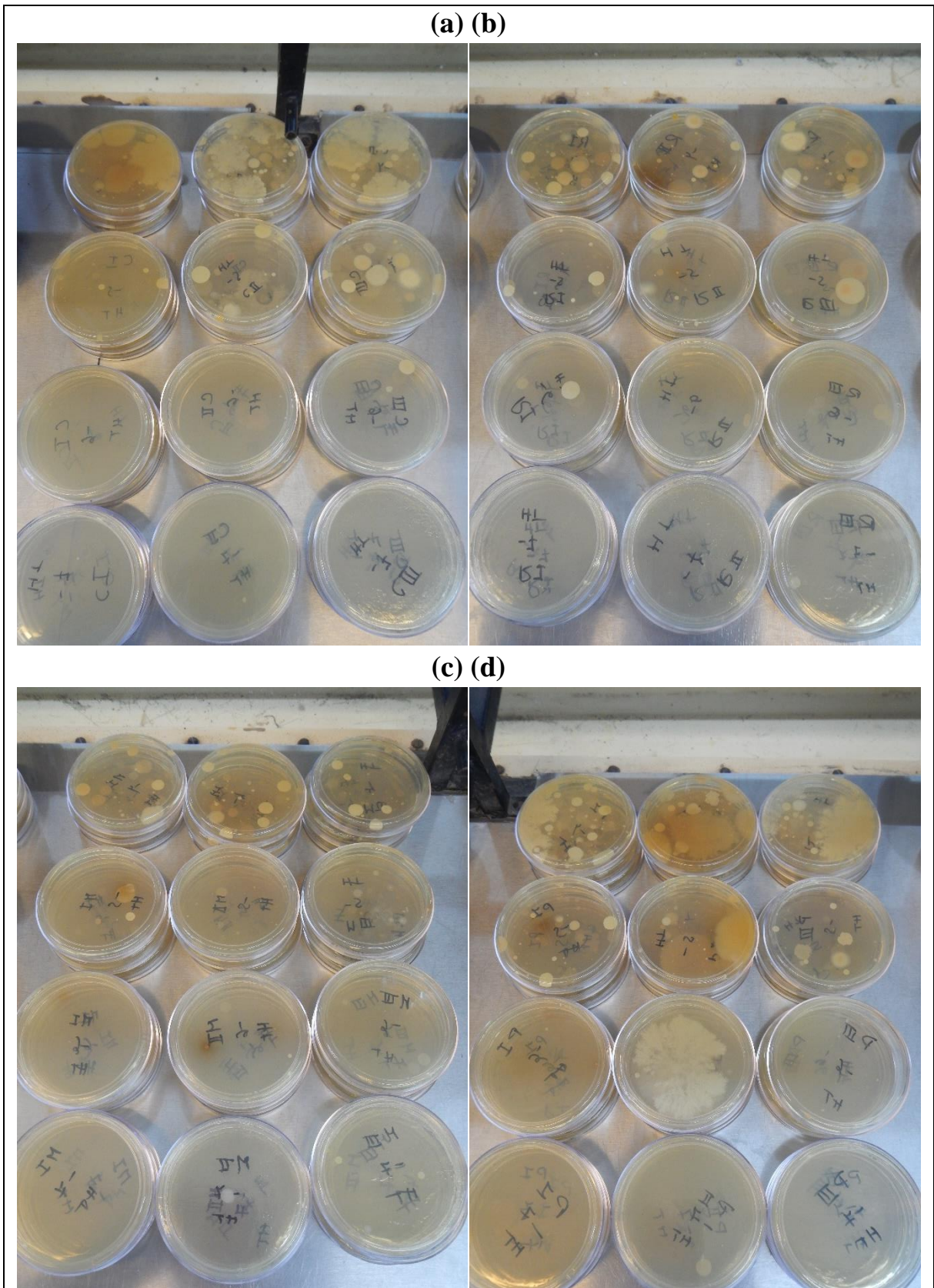


Fig. 10: Heterótrofos aerobios totales.

Aspecto general de las placas para cada tratamiento: **(a)** Clausura, **(b)** Rotación, **(c)** Monocultivo y **(d)** Pastura.

ANEXO III: MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo utilizados:

- Medio para celulolíticos: Celulosa (tiras de papel); K_2HPO_4 ; $NaNO_3$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; solución de elementos menores ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $MnCl_2 \cdot 2H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (Toresani *et al.*, 2011).
- Medio para amonificantes: Solución salina estándar (K_2HPO_4 ; $MgSO_4$; $NaCl$; $Fe_2(SO_4)_3$; $MnSO_4$); asparagina; solución de elementos menores (Frioni, 2011).
- Medio para nitrificantes: $(NH_4)_2SO_4$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; solución de Azul de Bromotimol; KH_2PO_4 ; quelato de hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$; EDTA disódico); solución de elementos menores (Schmidt y Belser, 1994).
- Medio agar-Rojo Congo para *Azospirillum spp.*: K_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $NaCl$; extracto de levadura; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; DL- ácido málico; KOH ; agar; solución de Rojo Congo. (Cassán *et al.*, 2013).
- Medio NFB semisólido para evaluar actividad diazotrófica microaerófila: ácido D-málico; K_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $NaCl$; $Ca_2Cl_2 \cdot 2H_2O$; solución de Azul de bromotimol; solución de elementos menores; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; KOH ; agar (Cassán *et al.*, 2013).
- Medio de cultivo Tripteína Soja Agar (TSA): Tripteína; peptona de soja; $NaCl$; agar (Toresani *et al.*, 2011).

Condiciones de crecimiento para soja:

- Test Burton modificado: luz blanca y roja; 6000 lux; luz/oscuridad 16/8 hs; $27^\circ C$; riego con solución Jensen ($CaHPO_4$; K_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $NaCl$; $FeCl_3$; solución de oligoelementos: H_3BO_3 ; Na_2MoO ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; KI ; $CaCl_2$) (Peticari *et al.*, 2013).