

2018



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Facultad de Ciencias
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Ecología

[INDICADORES MICROBIANOS DEL IMPACTO DE LA INTENSIFICACIÓN AGRÍCOLA SOBRE LA CALIDAD DEL SUELO EN SISTEMAS ARROCEROS]

Paola Iccardi

Orientadora: Dra. Andrea Rodriguez

Departamento de Biología Vegetal, Microbiología. Facultad de Agronomía

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	
2.1 Impacto de la actividad antrópica en ecosistemas naturales	3
2.2 Cultivo de arroz en Uruguay	4
2.3 El suelo como entidad viva	5
2.4 Calidad del suelo	6
2.5 Indicadores biológicos de calidad del suelo	7
Hipótesis y objetivos	12
3. Metodología	
3.1 Área experimental	13
3.2 Muestreo	14
3.3 Determinaciones realizadas	15
3.3.1 Respiración microbiana del suelo.....	15
3.3.2 Carbono de la biomasa microbiana.....	15
3.3.3 Actividades enzimáticas	16
3.3.4 Recuentos microbianos.....	17
3.3.5 Potencial del inóculo micorrícico	18
3.3.6 Perfil metabólico de la comunidad microbiana: Multi-SIR	18
3.4 Análisis estadísticos	19
4. Resultados	
4.1 Respiración y C biomasa microbiana	20
4.2 Actividades enzimáticas	20
4.3 Recuento de grupos microbianos.....	20
4.4 Potencial inóculo micorrícico.....	22
4.5 Perfil metabólico de la comunidad microbiana	23
4.6 Análisis correlación de Pearson y componentes principales.....	24
4.7 Sensibilidad de las variables	27
5. Discusión	28
6. Conclusiones y perspectivas	33
7. Anexo	
7.1 Capacidad de campo	35
7.2 Respiración microbiana.....	35
7.3 Carbono de biomasa microbiana.....	34
7.4 Actividades enzimáticas	36
7.4.1 Actividad Deshidrogenasa.....	36
7.4.2 Actividad de Fosfatasa Ácida y Alcalina.....	36
7.4.3 Hidrólisis de FDA.....	37
7.5 Perfil metabólico de la comunidad microbiana	38
7.6 Medios de cultivo para recuentos microbianos.....	39
8. Bibliografía.....	40

1. Resumen

La agricultura es la actividad humana que genera mayores alteraciones en los ecosistemas. Las áreas para uso agrícola han ido aumentando a lo largo de la historia y a fines del siglo 20 comenzó una tendencia a intensificar las mismas. Una posible consecuencia de esta intensificación es la degradación físico-química y biológica de los suelos. Los microorganismos son buenos indicadores de la calidad del suelo por responder a cambios en cortos períodos. Este trabajo buscó evaluar el impacto de la intensificación agrícola sobre la calidad del suelo mediante indicadores microbianos en sistemas arroceros. Las muestras fueron extraídas de un ensayo de rotaciones instalado en la estación Experimental “Paso de la Laguna” del INIA Treinta y Tres, iniciado en 2012. Se seleccionaron cuatro rotaciones con diferente grado de intensificación: R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga y R5: arroz-soja-pradera. Siendo R2 y R3 las más intensivas y R4 y R5 las menos intensivas. Se realizaron dos muestreos: octubre de 2014, las rotaciones se encontraban con pasturas o praderas; abril de 2015, las rotaciones se encontraban con cultivo de arroz previo a la cosecha. Se tomaron muestras compuestas de cada bloque, para la determinación de: respiración microbiana, carbono de la biomasa microbiana, medida de la actividad deshidrogenasa, fosfatasa ácida y alcalina, hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA), y recuentos microbianos (hongos totales, bacterias mesófilas totales, actinobacterias, y fijadores de nitrógeno). Para el muestreo de abril se incorporó la determinación del potencial de inóculo micorrízico, y el perfil metabólico de la comunidad microbiana por respiración inducida por sustrato (multi SIR). En los suelos con praderas no se determinaron diferencias significativas entre las rotaciones para los parámetros evaluados, excepto en el recuento de bacterias heterótrofas totales. En los suelos bajo cultivo de arroz, se obtuvieron diferencias significativas entre las rotaciones para: respiración, carbono de la biomasa microbiana, fosfatasa alcalina y ácida, porcentaje de arbusculos, respiración inducida por glucosa, ácido glutámico, histidina y ácido fumárico (Fisher $p < 0.05$). El análisis multivariado de los datos mediante PCA separó las rotaciones más intensivas (arroz-pastura corta y arroz-cultivos), de las menos intensivas (arroz-pradera larga y arroz-soja-pradera). Los indicadores microbianos evaluados permitieron de forma temprana determinar diferencias entre suelos de rotaciones arroceras de intensidad contrastante.

2. Introducción

2.1 Impacto de actividad antrópica en ecosistemas naturales.

Todos los organismos modifican su entorno, pero a diferencia de otros organismos, el hombre ha aprendido a capturar y utilizar en forma racional los recursos almacenados en una escala de tiempo corta, posibilitando así el desarrollo de la humanidad (Chalar, 2006). Muchos ecosistemas están dominados directamente por la humanidad y se estima que el 50% de la superficie terrestre libre de hielo está modificada por el hombre (Vitousek *et al.*, 1997). Una de las principales alteraciones que sufren los ecosistemas son los efectos sobre su estructura y funcionamiento, interfiriendo en la interacción de la atmósfera, con los sistemas acuáticos y con la tierra circundante (Vitousek *et al.*, 1997).

Dentro de las actividades antrópicas, la agricultura es la que genera mayores alteraciones en los ecosistemas a nivel mundial (Matson *et al.*, 1997; Eguren, 2005; De La Fuente y Suárez, 2008). Se estima que el 34% de la superficie terrestre, está siendo utilizada directamente con cultivos, ya sea para la producción de fibras o de alimentos. Esto hace a la agricultura la actividad humana con mayor uso de los ecosistemas terrestres (Lambin, 2006).

La expansión de la agricultura, ha cambiado a lo largo del tiempo y refleja en cierta medida el desarrollo de civilizaciones, economías y las poblaciones en crecimiento (Richards, 1990; FAO, 2004b). En los últimos 300 años la transformación de suelos agrícolas se ha producido de manera rápida. Estudios indican que las tierras de cultivo aumentaron de 3-4 millones de km² en 1700 a 15-18 millones de km² en 1990 (Ramankutty y Foley, 1999; Klein y Goldewijk, 2001). Sin embargo, fue en el siglo 20 donde estas transformaciones aumentaron notoriamente, tanto en alcance como en intensidad.

Desde 1950 la población mundial y el consumo per cápita han crecido considerablemente, aumentando la demanda de alimentos, fibras y energía. Esto conllevó a una expansión de la agricultura, observándose un aumento del 466% del área total de las tierras cultivadas entre 1700 y 1980 (Matson *et al.*, 1997). Sin embargo, a finales del siglo 20 se observó un cambio en la agricultura, la tasa de expansión de tierras cultivadas disminuyó, mientras que aumentó la intensificación de las mismas. El proceso de intensificación se define como el agregado de cantidades crecientes de factores de producción (capital y trabajo) para obtener una mayor cantidad de producto por unidad de tierra (Ernst y Siri-Prieto, 2011)

Cada vez más, la producción mundial de alimentos proviene de la intensificación, en lugar de la expansión de las tierras de cultivo. Mientras que entre 1961 y 2002 las superficies de cultivo aumentaron sólo un 15%, las zonas de regadío se duplicaron, el consumo mundial de fertilizantes aumentó 4,5 veces, y el número de tractores utilizados en la agricultura aumentó de 2,4 veces (FAO, 2004a).

La superficie destinada a cultivos aumenta año a año como resultado de una intensificación en el área agrícola tradicional y una expansión hacia nuevas agroregiones (Ernst y Siri-Prieto, 2011). Particularmente en Uruguay, la revolución agrícola comenzó a manifestarse a partir de la década de los 70', especialmente en los sectores productivos del arroz, los citrus, y la cebada.

2.2 Cultivo de arroz en Uruguay

El arroz es una especie anual perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceas), cuya semilla es comestible y constituye la base de la dieta de más del 40% de la población mundial (FAO; 2004).

Uruguay se sitúa entre los tres primeros países del mundo en términos de rendimientos medios, y dado que más del 95% de su arroz se exporta, se ha convertido en el 7º exportador más grande del mercado mundial (Zorrilla, 2013).

En los últimos 30 años el área cosechada aumentó aproximadamente un 155% y los rendimientos en términos de producción por área crecieron cerca de un 83%, según datos de la Asociación de Cultivadores de Arroz (ACA). En la zafra 2016/17 la superficie cultivada de arroz alcanzó las 164 mil hectáreas en todo el territorio nacional (DIEA, 2017).

Las principales zonas de cultivo son la zona norte, este y centro (Figura 1). La zona norte está formada por Artigas y Salto, ésta zona aprovecha la cuenca del río Cuareim. La zona centro integra a los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Durazno y Río Negro. La zona este es la que posee mayor cantidad de hectáreas utilizadas para este cultivo, está compuesta de Rocha, Treinta y Tres, Lavalleja y Cerro Largo, es la zona mejor adaptada para el cultivo debido a la existencia de planicies y cuencas importantes para su desarrollo.

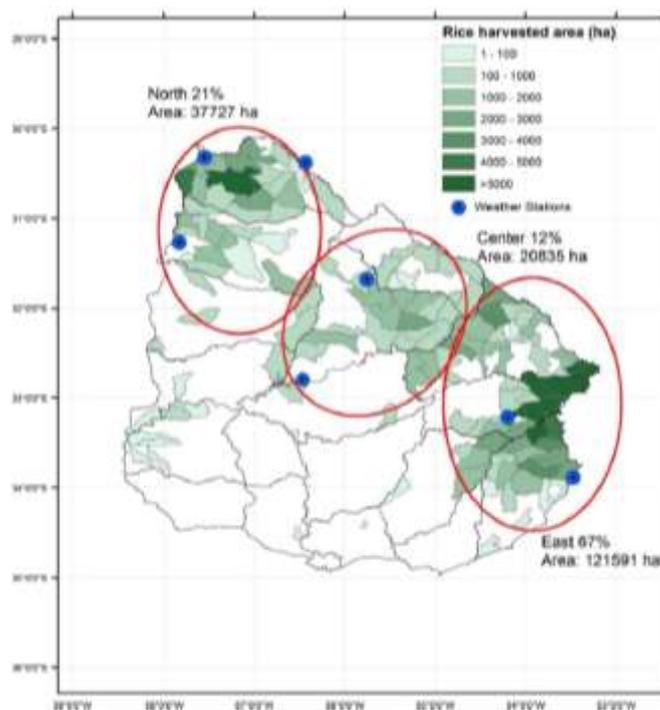


Figura 1. Mapa de la producción de arroz en Uruguay. Los círculos rojos indican las tres regiones de producción: Norte, Centro y Este. Extraído de. Fuente: Creada por Carracelas G. y Soares de Lima J., INIA.

El arroz se distingue de los otros cultivos por la utilización del suelo en rotaciones con producción ganadera y pasturas (Deambrosi, 2003). Este sistema de rotación cultivo-pastura, integrando la producción ganadera, es más sustentable debido a que mejora las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, disminuye la presencia de malezas, insectos y enfermedades, reduciendo de esta manera la frecuencia de aplicación de agroquímicos (Tarlera *et al.*, 2009). Con las pasturas el suelo queda cubierto lo que disminuye su erosión, ayuda a la agregación, porosidad, drenaje y aeración del mismo (Benintende *et al.*, 2008). Existen varios sistemas de rotación de producción de arroz, pero en líneas generales este cultivo ocupa dentro de la rotación un periodo aproximado del

25– 30% de la duración de la misma, lo que corresponde a un año de cultivo de arroz, alternado con un período de cuatro o cinco años de pasturas naturales regeneradas o siembra de praderas (mezcla de gramíneas y leguminosas) (Tarlera *et al.*, 2009).

Pero esta forma tradicional de cultivar arroz en Uruguay ha cambiado en los últimos años, siguiendo la tendencia mundial de la intensificación. Según la Asociación de Cultivadores de Arroz, este cambio se debe en parte a la disminución de los precios internacionales del arroz en los últimos tiempos, y los altos costos de producción, por lo que se buscan alternativas de producción que permitan sacar más ganancia (Terra *et al.*, 2014).

El sistema de rotación de arroz se ha ido diversificando al incluir otros cultivos. La soja es uno de los cultivos más utilizados en estos nuevos sistemas, ya que tiene una demanda creciente y altos precios en el mercado. En Uruguay hay poco registro de dicha incorporación, pero se sabe que los pioneros fueron productores de la cuenca de la Laguna Merín, incorporando soja a sus rotaciones en la década del 2000. INIA comenzó a

ejecutar proyectos para responder a las inquietudes del sector arrocero. Uno de sus proyectos, consiste en evaluar alternativas de intensificación del uso del suelo en rotaciones arroz-pastura- otros cultivos, siendo uno de sus sitios la estación experimental “Paso de la Laguna”, ubicada en el departamento de Treinta y Tres (Terra, 2017). Si bien esta incorporación es muy reciente en Uruguay, hay países exportadores de arroz que ya han incorporado otros cultivos en sus rotaciones (Verneti *et al.*, 2009; Anders y Hignight, 2010; Castillo *et al.*, 2013).

2.3 El suelo como entidad viva

El suelo es un sistema natural, vivo, complejo y dinámico, imprescindible para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Está constituido por: materia orgánica (derivadas de la biota en descomposición), sustancias inorgánicas (arena, limo y partículas de arcilla), gases (O₂, CO₂, N₂, N₂O y CH₄) y organismos vivos (Doran y Safely, 1997). Los microorganismos se encuentran en la fracción orgánica del suelo y representan generalmente menos del 5% del total del suelo. Habitan en microhabitats discretos donde las características físicoquímicas y biológicas varían en el espacio y en el tiempo (Stotzky, 1997). A pesar de esto, la diversidad de poblaciones microbianas es muy grande y se estima que existen aproximadamente 6000 genomas diferentes de bacterias por gramo de suelo tomando el tamaño del genoma de *Escherichia coli* como una unidad (Torsvik, *et al.*, 1998).

Los microorganismos presentes en el suelo, cumplen diversas funciones que son esenciales para los ecosistemas, entre ellas se destacan la participación en los ciclos del C, N, S, P, el rol activo en la inmovilización de metales pesados, y la participación en la estructuración del suelo (Bueno dos Reis y Carvalho Mendes, 2007).

El suelo es un recurso finito, por tanto su pérdida y degradación no son reversibles a escala humana. Pese a que es un recurso natural muy valioso, ya que brinda muchos servicios ecosistémicos, no está siendo conservado debidamente. La superficie de suelos productivos es limitada y está bajo una creciente presión dada por la intensificación y el uso de los suelos con fines agrícolas, forestales, pastorales y de urbanización, para cubrir la demanda de producción de alimentos, energía y extracción de materias primas de la creciente población. Los suelos deben ser reconocidos y valorados por sus capacidades productivas y por su contribución a la seguridad alimentaria y al mantenimiento de servicios ecosistémicos fundamentales (FAO, 2015).

En este sentido, los servicios ecosistémicos, hacen referencia a los beneficios que los ecosistemas proporcionan a los seres humanos. Dentro de los servicios fundamentales se encuentran los de apoyo, que constituyen la base de todos los ecosistemas y sus servicios, donde el suelo tiene un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y es el asiento natural para la producción de alimentos y materias primas de los cuales depende la sociedad mundial (FAO, 2015). Para que el hombre pueda seguir haciendo uso de estos servicios es necesario conservar la calidad del suelo.

2.4 Calidad del suelo

La calidad del suelo se define como la capacidad continua del suelo de funcionar (dentro de los límites del sistema natural o antrópico), mejorar o mantener la productividad de las plantas y animales, controlar la calidad del agua y del aire, y mantener la salud del hombre, de las plantas y de los animales (Doran y Parkin, 1994). Depende de las propiedades físicas (por ejemplo, densidad aparente, profundidad, textura), químicas (por ejemplo, C orgánico, N extraíble, P extraíble) y biológicas (por ejemplo, respiración, actividades enzimáticas, biomasa microbiana).

La calidad del suelo tiene influencia en cinco funciones del suelo (a) aceptar, retener y liberar los nutrientes; (b) aceptar, retener y liberar el agua tanto para las plantas, para la superficie y la recarga de las aguas subterráneas; (c) promover y apoyar la raíz en crecimiento; (d) mantener el hábitat biótica adecuada; y (e) responder al manejo y a la degradación (Larson y Pierce 1991; Brejda *et al.*, 2000).

Si bien hay características físicas, químicas y biológicas del suelo que dependen del clima y demás componentes del ecosistema, lo que determina la calidad o salud del suelo es el manejo de la tierra (Doran, 2002).

2.5 Indicadores biológicos de calidad de suelo

Los indicadores son usados en muchos ámbitos del conocimiento (economía, salud, recursos naturales, etc.). Representan instrumentos de análisis que nos permiten simplificar, cuantificar y comunicar fenómenos complejos (Adriaanse, 1993).

En el caso de evaluar la calidad de suelos, los indicadores deben ofrecer información sobre las características, propiedades y los procesos del suelo. Sirven para medir y dar seguimiento de los efectos del manejo sobre el funcionamiento del suelo en un periodo dado (Astier *et al.*, 2002). La preservación de la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota se considera un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad del suelo (Alef, 1995).

Para evaluar la calidad del suelo se pueden utilizar diversos parámetros ya que en su funcionamiento están involucradas varias propiedades físicas, químicas y biológicas. Hay que tener en cuenta que los parámetros físicos y físico-químicos del suelo en general, se alteran solamente cuando este experimenta cambios drásticos en el uso del suelo (Bozzo, 2010). Por el contrario, los parámetros biológicos y bioquímicos son muy sensibles a leves modificaciones en el manejo de prácticas y cambios en el uso del suelo, lo que proporciona información dinámica acerca de los cambios en la calidad del mismo (Filip, 2002; Nannipieri *et al.*, 2003, Raiesi, 2007). Las transformaciones bioquímicas llevadas a cabo por la actividad enzimática, puede preceder a cambio en propiedades físicas y químicas, constituyendo una alerta sobre la degradación que sufre el suelo y un signo temprano de recuperación (Kandeler *et al.*, 1999). Específicamente, las propiedades

bioquímicas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos de los elementos (C, N, P y S) son utilizados para diagnosticar la calidad del suelo.

Los indicadores biológicos son sensibles a cambios en el uso del suelo y para ser considerados como ideales deberían representar uno o varios atributos del suelo, ser fácilmente medibles, rápidos, tener sensibilidad en un amplio rango del manejo del suelo, también tener un bajo error de muestreo y revelar con exactitud qué problema existe (Schloter *et al.*, 2003). En tal sentido, los microorganismos son potencialmente buenos indicadores por responder a prácticas de manejo de suelos en cortos períodos de tiempo (meses, años). Por ejemplo, cambios en biomasa microbiana o en la abundancia de grupos funcionales de microorganismos (hongos micorrícicos, microorganismos celulolíticos) pueden ser detectados antes de evidenciar cambios en la materia orgánica u otras propiedades físicas y químicas del suelo (Sparling, 1992).

Diversos estudios han tratado de identificar que parámetros son más sensibles para utilizar como indicadores de calidad de suelo. Entre los más reportados se encuentran el C de la biomasa, el cual mostró ser sensible a cambios en la calidad del suelo asociado a vegetación, a distintos tipos de cultivos y rotaciones, a diferentes métodos para recuperar suelos y al uso de labranza (Nogueira *et al.*, 2006; Zagal, *et al.*, 2009; Anderson y Domsch, 2010; Muscolo *et al.*, 2014; Mganga *et al.*, 2016). Las actividades enzimáticas fueron reportadas como indicadores sensibles a cambios estacionales, al tipo de labranza, y a cambios en el uso del suelo de áreas naturales a agrícolas (Wang *et al.*, 2007; Zagal *et al.*, 2009; Muscolo *et al.*, 2014; Mganga *et al.*, 2016;).

Para que los indicadores puedan ser utilizados en un plan de monitoreo, los datos obtenidos tienen que estar contenidos dentro de una escala o tener puntos de comparación. En el caso de calidad del suelo Rodrigues de Lima *et al.*, (2008) sugieren generar un conjunto mínimo de datos para poder ser utilizados a nivel regional ya que el impacto que pueden tener las actividades agropecuarias, varía según el tipo de suelo a nivel regional.

Si bien hay parámetros que aparecen en diversos estudios como buenos indicadores, no hay un consenso de los mismos. Estudios en distintas partes del mundo, se han dedicado a evaluar parámetros físicos, químicos y biológicos para establecer un conjunto mínimo de indicadores con sus límites e índices según los diferentes órdenes de suelo y usos agrícolas (Benintende *et al.*, 2015; Biswas *et al.*, 2016).

A continuación, se resumen las características de algunos parámetros biológicos utilizados como indicadores de calidad de suelo:

Respiración microbiana

La respiración microbiana es un parámetro muy utilizado como indicador de calidad. El suelo tiene un rol primordial en el ciclo del C y la respiración microbiana genera una importante salida de CO₂ al ambiente. La generación de CO₂, evidencia el metabolismo de los organismos que allí habitan, ya que el uso de materia orgánica y oxígeno como

fuentes redox es utilizado por los microorganismos heterótrofos aerobios descomponedores de la materia orgánica (Anderson 1982).

Biomasa microbiana

La biomasa microbiana representa el componente biótico de la materia orgánica del suelo (Jenkinson y Ladd, 1981) excluyendo a la microfauna y a las raíces de los vegetales. Cumple un rol importante en funciones primordiales de los ecosistemas: es fuente y sumidero de nutrientes, participa en los ciclos del C, N, P, y S así como en la inmovilización de metales pesados (Gil-Stores *et al.*, 2005). Está constituido por organismos metabólicamente activos, principalmente bacterias y hongos y sus estructuras de resistencia y reproducción (Jenkinson y Ladd, 1981). Por todas estas características es considerado un buen indicador de calidad de suelo.

Uno de los métodos más utilizados para cuantificar el C biomasa microbiana es a través de la fumigación. Cuando se fumigan las muestras, se matan la mayor parte de los microorganismos. A partir de esto se puede determinar el C orgánico procedente de la muerte de los microorganismos, mediante la medida del incremento en la respiración del suelo (fumigación-incubación) (Jenkinson y Powlson, 1976). En este método el C de la biomasa es determinado por la diferencia que existe en la respiración de suelos fumigados contra los controles (no fumigados).

Actividades enzimáticas

Las enzimas intervienen en la mayoría de los procesos que tienen lugar en el suelo. Son muy importantes en procesos de mineralización, inmovilización de nutrientes, fijación biológica de nitrógeno, entre otros (Dick y Tabatabai, 1993; Coyne, 2000; Caldwell, 2005; Carpa, 2009). En lo que respecta a la mineralización, participan en la transformación de compuestos orgánicos complejos a sustancias asimilables por las plantas y catalizan las etapas limitantes en la mineralización de nutrientes.

Las principales enzimas se pueden clasificar en oxidoreductasas por ejemplo la catalasa, glucosa oxidasa, deshidrogenasa y peroxidasa; transferasas como la transaminasa e hidrolasas como la celulasa, lipasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa (Alef, 1995, Paul y Clark, 2007). Otra manera de clasificar las enzimas es según dónde actúen. Las enzimas asociadas a células viables, pueden actuar en citoplasma, periplasma o asociadas a la superficie externa. Por otro lado, las enzimas "abióticas" provienen de células vivas que las excretan durante su crecimiento o división y son liberadas a la fracción soluble del suelo (Kandeler y Dick, 2007).

Las enzimas deshidrogenasas son consideradas buenos indicadores de calidad del suelo ya que solo actúan en células viables. Están implicadas en vías importantes como la glucólisis, fermentación y ciclo de Krebs). La actividad general de las deshidrogenasas consiste en la transferencia de hidrógenos desde un sustrato orgánico, a un cofactor enzimático. (Ríos-Velázquez *et al.*, 2008)

Las fosfatasas son enzimas implicadas en la mineralización de fósforo orgánico, que catalizan la hidrólisis de ésteres y de anhídridos de ácido fosfórico (Nahas, 2002). Las fosfatasas ácidas se encuentran principalmente en suelos ácidos, mientras que las alcalinas predominan en suelos con pH básico (Tabatabai, 1994). Estas enzimas no son liberadas únicamente por microorganismos del suelo sino también por las raíces de las plantas; y a su vez existen enzimas libres que conservan sus propiedades una vez muerto el organismo del cual proceden. Invertebrados como las lombrices de tierra también liberan P. Sin embargo, se asume que la mayor cantidad de enzimas en el suelo provienen principalmente de los microorganismos (Santruckova *et al.*, 2004).

Dentro de las enzimas hidrolíticas, la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) se ha convertido en un buen indicador de calidad del suelo (Alef, 1995). Es una reacción que involucra diversos grupos de enzimas, las cuales catalizan la hidrólisis de proteínas, lípidos, fosfolípidos, y polipéptidos (Zahir *et al.*, 2001). Estas enzimas están implicadas en la degradación de muchos tipos de tejidos en el suelo y de microorganismos (Nannipieri *et al.*, 2003).

Recuentos microbianos

Hay diversos grupos funcionales de bacterias que son utilizados como indicadores de calidad del suelo. Generalmente estos grupos cumplen un rol importante en las funciones del suelo, y variaciones en el número puede dar idea de que funciones son más afectadas por cambios en el uso del suelo. Algunos de los grupos funcionales estudiados son: fijadores de nitrógeno, nitrificantes, desnitrificantes, celulolíticas, heterótrofas totales, pseudomonas y actinobacterias.

También se ha demostrado que los hongos son buenos indicadores, ya que son sensibles a cambios en el uso del suelo (Roper y Ophel-Keller, 1997), por lo que son incluidos en los recuentos.

Si bien es posible tener una idea de que microorganismos han sido afectados por la intensificación en el uso del suelo, hay que tener en cuenta que solamente es posible cultivar el 1% de la microflora edáfica a partir de medios de cultivo artificiales (Frioni, 2006). Para superar esto, se han desarrollado métodos independientes de cultivos a partir de técnicas moleculares (Theron *et al.*, 2000). Estudios de cinéticas de reasociación sobre muestras de ADN de suelo, han permitido estimar que un gramo de suelo comprende entre 2.000 y 18.000 genomas procariotas distintos (Torsvik *et al.*, 2002). Si bien muchos de estos métodos proporcionan una valiosa información acerca de la diversidad y la evolución de microbios, dan pocos datos acerca del papel funcional de estos dentro de su hábitat (Suarez, 2010).

Perfil metabólico de la comunidad microbiana

La comunidad microbiana es considerada como el componente vivo esencial del suelo, y su diversidad ha sido empleada como una medida para evaluar la calidad del suelo (White y MacNaughton, 1997). La pérdida de funciones de la comunidad microbiana es considerado como una disminución en la salud del suelo (Chapman *et al.*, 2007). Estudios

recientes muestran que la calidad del suelo puede ser evaluada mediante medidas de la comunidad microbiana, en particular perfiles fenotípicos acoplado con perfiles funcionales de la comunidad microbiana (inducción de la respiración con diferentes sustratos) (Ritz *et al.*, 2009).

Existen varios métodos para evaluar el perfil funcional de la comunidad microbiana. El método Biolog (Garland y Mills, 1991) consiste en una placa con pocillos los cuales contienen diferentes fuentes de carbono y un indicador. La utilización de los diferentes sustratos por las muestras se visualiza por la coloración del indicador.

Otro método es el de inducción de la respiración por múltiples sustratos (multi- SIR) (Degens y Harris, 1997) que mide el CO₂ liberado en muestras de suelos ante la utilización de diferentes fuentes de carbono. Las muestras son colocadas en frascos cerrados y el CO₂ obtenido se mide través de un cromatógrafo de gases.

Más recientemente se desarrolló el método MicroRespTM que combina los dos anteriores (Campbell *et al.*, 2003). Esta técnica se basa en la utilización de una placa con pocillos, donde se ponen las muestras con los diferentes sustratos y un indicador de pH; el CO₂ liberado reacciona con el indicador y es leído por colorimetría.

Potencial de inóculo micorrízico

Las asociaciones benéficas que establecen los microorganismos con plantas son también buenos indicadores de la calidad del suelo. Dentro de los microorganismos capaces de formar estas asociaciones se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que colonizan las raíces de las plantas, formando una extensa red de micelio en el suelo y mejoran la capacidad de absorción de agua y nutrientes (Smith y Read, 1997). Estos microorganismos benéficos son importantes para la sobrevivencia y desarrollo de las plantas y pueden ser afectados por el manejo del suelo (Sanjurjo, 2009).

Una de las maneras de abordar el estudio de este tipo de asociaciones es mediante la determinación del potencial micorrízico que se estudia a través de bioensayos. Esta técnica se fundamenta en la relación proporcional que se establece entre la densidad de propágulos micorrízicos infectivos en el suelo y la colonización de la raíz en estadios tempranos del desarrollo de la planta (Moormann y Reeves, 1979; Baltruschat y Dehne, 1988). Se utilizan como plantas trampa especies que sean altamente micorrizables y se determina el porcentaje de colonización micorrízica en sus raíces.

Debido a la tendencia cada vez más creciente de intensificar la producción agrícola en Uruguay y los posibles problemas que esto trae en el suelo es que nos proponemos evaluar sistemas de cultivo de arroz, donde dicha intensificación también se hace presente.

Hipótesis

Los parámetros biológicos y bioquímicos son muy sensibles a leves modificaciones en el manejo de prácticas y cambios en el uso del suelo, lo que proporciona información acerca de los cambios en la calidad del mismo. La intensificación agrícola en los sistemas arroceros, afecta negativamente los parámetros microbianos, haciendo que disminuyan en los sistemas más intensivos, los cuales pueden ser tomados como indicadores de la calidad del suelo.

Objetivos

-Objetivo general: evaluar el impacto de la intensificación agrícola en sistemas arroceros mediante indicadores microbianos de calidad del suelo.

-Objetivos específicos:

- Evaluar el impacto de alternativas contrastantes de intensificación agrícola sobre parámetros bioquímicos del suelo: biomasa microbiana, respiración basal y actividades enzimáticas.
- Cuantificar el efecto de alternativas contrastantes de la intensificación agrícola sobre la abundancia de grupos microbianos: bacterias heterótrofas totales, actinobacterias, fijadores de nitrógeno y hongos.
- Determinar el efecto de la intensificación agrícola sobre el potencial micorrícico del suelo.
- Evaluar si la intensificación en los sistemas arroceros provoca un cambio en el perfil metabólico de la comunidad microbiana.

3. Metodología

3.1 Área experimental

El presente trabajo se realizó en el ensayo instalado en el año 2012 en la estación Experimental "Paso de la Laguna" del INIA ubicado en el departamento de Treinta y Tres (S 33° 15,936 W 54° 10,384) (Figura 2) y asociada a la cuenca de la Laguna Merín. La unidad "Paso de la Laguna" es representativa de la Zona Baja o planicie arrocera, caracterizada por una topografía plana utilizada para el cultivo de arroz.

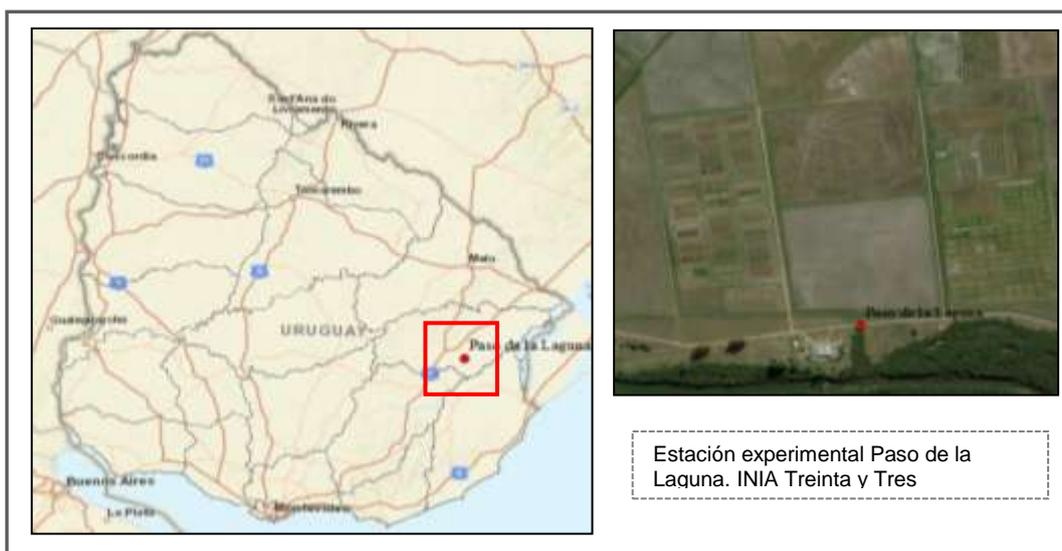


Figura 2. Mapa de Uruguay. Indicada la ubicación de la Estación Experimental Paso de la Laguna del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria del departamento de Treinta y Tres (S 33° 15,936 W 54° 10,384)

El experimento se instaló sobre suelos Brunosoles subéutricos, con historia de rotación arroz-praderas desde el año 1979.

El ensayo consta de seis rotaciones de cultivos de arroz, con diferente grado de intensificación:

Rotación 1 (R1): monocultivo de arroz, se cultiva arroz y pastura, y luego se repite lo mismo en los años siguientes.

Rotación 2 (R2): arroz - cultivos, se cultiva arroz en el primer año seguido de una pastura de raigras. En el segundo año se cultiva soja y posteriormente pastura de trébol alejandrino (*Trifolium alexandrinum*). Durante el tercer año se repite el proceso del primer año y en el cuarto año se cultiva sorgo seguido de pastura de trébol alejandrino.

Rotación 3 (R3): arroz -pradera corta, se cultiva arroz seguido de una pradera de raigras y trébol rojo de un año y medio. En el tercer año se vuelve a sembrar arroz.

Rotación 4 (R4): arroz - pradera larga, consiste en dos años de cultivo de arroz y luego una pradera de festuca, trébol blanco y lotus durante tres años.

Rotación 5 (R5): arroz-soja - pradera, se cultiva arroz seguido de un raigras. En el segundo y tercer año se cultiva soja seguido de raigras y trébol alejandrino. En el cuarto año arroz seguido de pradera de *Festulolium* y lotus de dos años.

Rotación 6 (R6): arroz-soja, se cultiva arroz seguido un raigras y en el segundo año soja seguido de trébol alejandrino (*Trifolium alexandrinum*).

Las parcelas presentan dimensiones de 18 m de ancho y 60 m de largo, en 3 bloques, encontrándose aisladas individualmente. El diseño experimental es un diseño básico donde todos los estadios de las rotaciones están presentes simultáneamente.

El manejo del cultivo de arroz fue similar para todas las rotaciones e incluyó aplicación de herbicidas, fungicidas e insecticidas y fertilización con N. La fertilización fosfatada se realiza solo cuando las parcelas poseen niveles de P por debajo de 6-7 ppm; en las parcelas donde se realizó este trabajo no fue necesario agregar P.

3.2 Muestreos

Se realizaron dos muestreos de suelo:

- 1) en primavera (octubre de 2014), donde las rotaciones se encontraban con pasturas o praderas pero con diferente duración e historia de cultivos. Para este muestreo se extrajeron muestras de las rotaciones R3, R4 y R5.
- 2) en otoño (abril de 2015), donde las rotaciones se encontraban con cultivo de arroz previo a la cosecha. Se extrajeron muestras de las rotaciones R2, R3, R4 y R5 (Figura 3).

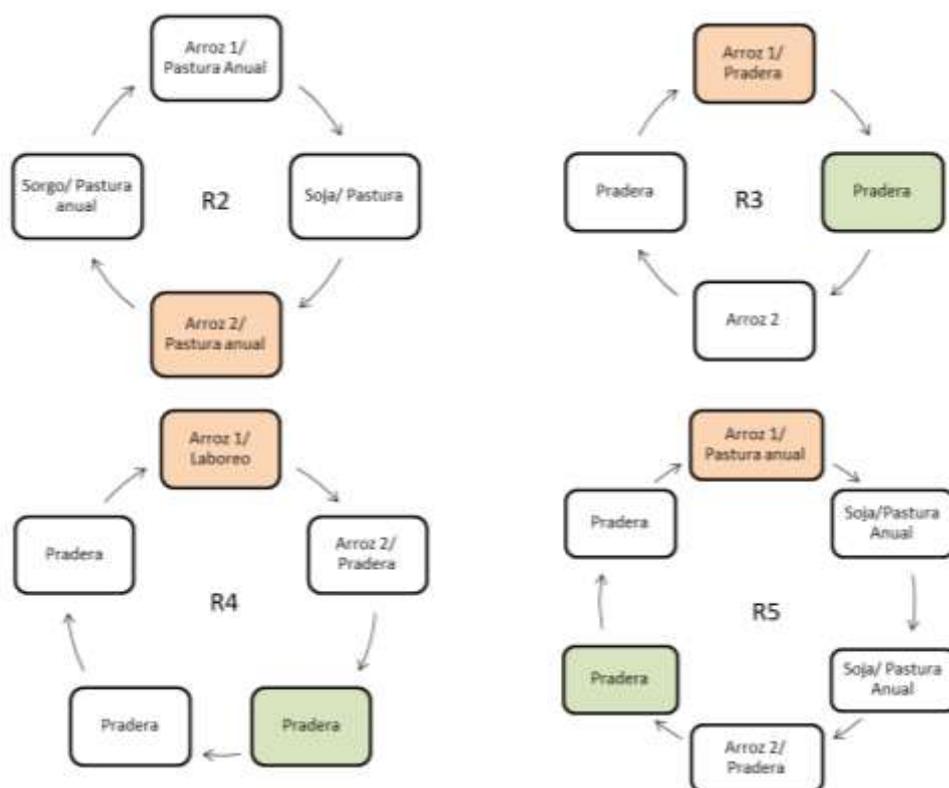


Figura 3. Descripción de cuatro de las rotaciones arroceras de la estación experimental “Paso de la Laguna” (INIA, treinta y tres) utilizadas en este trabajo. R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera. En cada cuadrante se muestra lo realizado por año en cada rotación. Se indica con color el lugar en el ciclo donde fueron extraídas las muestras de suelos: verde muestreo de pradera (primer muestreo) y rojo muestreo de arroz (segundo muestreo).

De cada parcela se tomaron 10 submuestras sacadas con calador a una profundidad de 15 cm, constituyendo una muestra compuesta por parcela.

Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y tamizadas (2 mm), luego de lo cual se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su análisis. Para las actividades enzimáticas los ensayos se realizaron en el menor plazo posible.

3.3 Determinaciones realizadas

3.3.1 Respiración microbiana del suelo

Se evaluó mediante un método indirecto que cuantifica la cantidad de C-CO₂ mineralizado en muestras de suelo en condiciones controladas de temperatura y humedad (Schinner *et al.*, 1996).

Para esto se pesaron 50 g de suelo, y cada muestra se puso en un frasco hermético de vidrio con capacidad de 1 L. El suelo se llevó al 75% de su capacidad de retención hídrica (el cálculo de la capacidad de campo se detalla en el Apéndice 1). En el interior del frasco se colocó un recipiente con 20 ml de NaOH 0,5 N. Este NaOH reacciona con el CO₂ liberado por la respiración edáfica formando carbonato de sodio. Los frascos cerrados herméticamente se incubaron en estufa durante 10 días a 28° C. Al cabo de ese tiempo se extrajeron los recipientes con NaOH y se pasaron cada uno a un vaso de bohemia con ayuda de agua destilada. Luego se añadió 5 ml de BaCl₂ 2% con el fin de convertir el carbonato de sodio en carbonato de bario insoluble y unas gotas de fenofaleína para poder hacer la titulación. De este modo se valoró el NaOH libre, aquel que no reaccionó con el CO₂ de la respiración edáfica. La titulación se hizo con HCl 0,5 N.

En el anexo se especifican los cálculos realizados.

3.3.2 Carbono de la biomasa microbiana

Se determinó mediante el método de Fumigación-Incubación según Jenkinson y Powlson (1976). Las muestras de suelo fueron expuestas a vapores de cloroformo durante 48 horas, esto permitió eliminar la mayor cantidad de microflora. Luego de eliminados los vapores de cloroformo se reinocularon las muestras con 0,5% de suelo fresco. Se utilizó la misma cantidad de suelo, los mismos reactivos y condiciones que en el caso de la respiración basal. De esta manera se determinó el carbono mineralizado de dicha biomasa mediante el incremento de CO₂ respirado de las muestras fumigadas frente a las no fumigadas. Los resultados se expresaron como mg de C-CO₂ g⁻¹ de suelo seco. Los cálculos se muestran en el anexo.

Se calculó el cociente metabólico microbiano (qCO₂) como la relación entre el CO₂ producido por respiración microbiana y el C de la Biomasa microbiana.

3.3.3 Actividades enzimáticas

-Medida de la actividad Deshidrogenasa

Se determinó mediante un método basado en la medida espectrofotométrica del iodonitrotetrazolioformazán (INTF) producido por la reducción del 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT), cuando el suelo es incubado con INT en un medio tamponado y en oscuridad (Schinner *et al.*, 1996). Como control se usa suelo esterilizado en autoclave.

A 1 g de suelo se le agregó 1,5 ml de buffer Tris 1M pH 7 y 2 ml de solución de sustrato INT. Los tubos se protegieron de la luz con papel aluminio y se incubaron en baño durante 2 horas a 40°C sin agitación. Al cabo de este tiempo se le agregó 10 ml de acetona comercial y dejó 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad, agitando cada 20 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 3 minutos. Se midió en cubeta de vidrio el INTF a 464 nm, contra el blanco acetona. Por cada muestra se realizaron dos repeticiones.

La actividad deshidrogenasa se expresó en μg de INTF por gramo de suelo seco por hora. La preparación de sustratos y los cálculos de la actividad, se detallan en el anexo.

-Medida de actividad de las fosfatasas ácida y alcalina

El método que se utilizó se basa en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando el suelo es incubado con una solución tamponada de p-nitrofenilfosfato (Schinner *et al.*, 1996).

A 1 g de suelo se le agregó 1ml de solución sustrato y 4 ml de buffer de distinto pH según sea fosfatasa acida o alcalina (apéndice 1). Se incubó 1 hora en baño con agitación a 37° C. Después de la incubación se agregó 1ml de CaCl_2 0,5M y 4ml de NaOH 0,5 M. La actividad se midió en espectrofotómetro a 400 nm. Para la fosfatasa acida fue necesario diluir 1/10 y su blanco también. En los controles se agregó solución sustrato luego de la incubación.

La actividad fosfatasa se expresó en μg de p-nitrofenol/g suelo seco /hora.

La preparación de sustratos, la curva y los cálculos de la actividad se detallan en el anexo.

- Hidrólisis de FDA

El método utilizado se basa en la determinación espectrofotométrica de la fluoresceína liberada cuando el suelo es incubado con una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) (Schinner *et al.*, 1996).

A 1g de suelo se le agregó 10 ml de buffer fosfato y 0,1 ml de diacetato de fluoresceína. Se incubó en baño con agitación durante 2 horas a 24°C. La reacción se cortó con 10 ml de acetona. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm. La actividad se midió en espectrofotómetro a 490 nm. Se realizaron dos repeticiones por muestra. La actividad fue expresada en μg de fluoresceína/ g de suelo seco/hora. La preparación de sustratos, la curva y los cálculos de la actividad se detallan en el anexo.

3.3.4 Recuentos microbianos

Algunos grupos fisiológicos fueron detectados mediante el método de recuento de viables en placa.

Los recuentos realizados fueron hongos totales, bacterias mesófilas totales, actinobacterias, y fijadores de nitrógeno (Frioni, 2011).

Las diluciones se realizaron en NaCl 0,9% estéril. Se utilizaron diferentes diluciones, y distintos medios según el grupo fisiológico estudiado. Fueron sembradas dos repeticiones por muestra.

Para los hongos totales el medio utilizado fue Potato Dextrosa Agar (PDA) al que se le añadió como antibiótico 200 mg/L de cloranfenicol y las diluciones sembradas fueron: para el muestreo con pradera -2, -3 y -4; para el muestreo con arroz -1, -2 y -3. La incubación se realizó 7 días a 24°C.

Para las bacterias mesófilas totales el medio utilizado fue Plate Count Agar (PCA) al que se le agregó 200mg/L de cicloheximida como antifúngico y las diluciones sembradas fueron: para muestreo con pradera -4, -5 y -6; para el muestreo con arroz -3,-4 y -5. Se incubó 3 días a 28°C.

Para las actinobacterias se utilizó el medio almidón-caseína (SCA) al que se le añadió 150mg/L de cicloheximida y las diluciones sembradas fueron: en el muestreo con pradera -3, -4y -5; para el muestreo con arroz -1, -2, -3. Se incubó 5 días a 28°C.

Para las bacterias fijadoras de nitrógeno se utilizó el medio LG y las diluciones utilizadas fueron: para el muestreo con pradera -3, -4 y -5; para el muestreo con arroz -1, -2 y -3. Se incubó 6 días a 28°C.

La composición de los medios utilizados se encuentra especificada en el anexo.

3.3.5 Perfil metabólico de la comunidad microbiana: multi-SIR (respiración inducida por múltiples sustratos)

Para las muestras R2, R4 y R5 del muestreo de suelos con arroz, se analizó el perfil metabólico de la comunidad microbiana. El método utilizado fue multi-SIR (Harris y Degens, 1997).

Se utilizaron botellas de 26 ml a las cuales se le añadió 1 g de suelo y 2 ml de sustrato. Las botellas se cerraron con prensil y tapón de goma y se incubaron por 4 horas a 28°C, vortexeando cada 1 hora durante 15 segundos y a los 10 minutos antes de medir. Al cabo de ese tiempo se extrajo el CO₂ respirado con jeringa (5.mL) y se midió en cromatógrafo de gases a 60° C (Agilent, modelo 7890B). Se emplearon 13 sustratos: dos carbohidratos (glucosa y manosa) a una concentración final de 75 mM; cuatro aminoácidos (L-asparagina, L-arginina, histidina y serina) a una concentración final de 10mM y siete ácidos carboxílicos (glutámico, succínico, DL málico, cítrico, L-ascórbico, oxálico y fumárico) a una concentración final de 100mM. Las concentraciones fueron las ajustadas y sugeridas por Degens y Harris (1997). Se realizaron dos repeticiones por muestra y como controles se empleó el suelo humedecido con 2 mL de agua destilada. Los cálculos de la respiración se detallan en el anexo.

3.3.6 Potencial de inóculo micorrícico

Para las muestras R2, R3, R4 y R5 del muestreo de suelos bajo cultivo de arroz se realizó un bioensayo para determinar el potencial micorrícico del suelo.

Se utilizaron macetas con una capacidad de 250 g que se llenaron con una mezcla de 150 g de suelo + 50 g de vermiculita estéril. En cada maceta se sembraron 5 semillas de cebolla que luego de la germinación se ralearon a 3 plantines por maceta. Por cada parcela se prepararon tres macetas. Las macetas se distribuyeron en el invernadero en un diseño experimental completamente al azar, donde permanecieron por 60 días con riegos con agua estéril a peso constante. En el momento de la cosecha las raíces de las 3 plantas de cada maceta se lavaron con agua de la canilla, se aclararon a baño maría con KOH 10% durante 3 minutos y se tiñeron con azul tripán al 0.05% en vinagre. Por cada maceta se cortaron 30 trozos de raíces de 1 cm de longitud, lo que constituyó una muestra de 90 observaciones por parcela. Las raíces se montaron entre porta y cubre y se observaron bajo microscopio óptico a 10X y 40X. Se registraron elementos micorrícicos (arbúsculos, hifas, vesículas o esporas) y se calculó el porcentaje de micorrización de cada maceta (Trouvelot *et al.*, 1986).

3.4 Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos los datos de las variables continuas, que poseen distribución normal, fueron analizados utilizando un Modelo Lineal General (MLG) mediante análisis de varianza, ANOVA, seguido del test de LSD Fisher ($p < 0.05$). Los datos de las variables discretas, que no poseen distribución normal (porcentaje de micorrización total, arbúsculos y vesículas), fueron analizados

utilizando un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), familia Quasibinomial, seguido de test de Fisher ($p < 0.05$) mediante el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2015).

4. Resultados

4.1 Respiración y C de la biomasa microbiana

En el suelo bajo pradera (primer muestreo) los valores de respiración, así como los de C-biomasa microbiana no presentaron diferencias significativas entre las rotaciones. Mientras que en el muestreo de suelo bajo arroz (segundo muestreo) se obtuvieron diferencias significativas en la respiración, en el C de la biomasa microbiana y en el qCO_2 (Tabla 1). El suelo de R4 presentó el mayor valor de respiración, diferenciándose significativamente del resto de los suelos. En el C de la biomasa microbiana el suelo de R5 obtuvo el mayor valor diferenciándose significativamente de los demás tratamientos. En qCO_2 R4 presentó el mayor valor diferenciándose significativamente de R5 (Tabla 1).

Tabla 1. Respiración y carbono de la biomasa microbiana de suelo bajo pradera y arroz de las rotaciones

Rotaciones	Respiración (mg CO ₂ /g suelo/10 días)		C de biomasa microbiana (mg C-CO ₂)		qCO ₂ (mgCO ₂ /mg C-CO ₂)	
	Suelo pradera	Suelo arroz	Suelo pradera	Suelo arroz	Suelo pradera	Suelo arroz
R2	ND	2.4 a	ND	10,9 a	ND	0.2 ab
R3	16,8 ns	2.5 a	11,3 ns	10,5 a	1.5 ns	0.2 ab
R4	18,8 ns	4.9 b	18,1 ns	12,5 a	1.0 ns	0.4 b
R5	16,7 ns	2.5 a	14,8 ns	19,7 b	1.1 ns	0.1 a

Los valores representan la media de los tres bloques. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). ns indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos. R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

4.2 Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas no presentaron diferencias significativas entre los suelos con pradera para ninguno de los tratamientos evaluados (Tabla 2). En suelo con arroz, la actividad Fosfatasa alcalina presentó diferencias significativas, donde R5 presentó la mayor actividad diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. La actividad Fosfatasa ácida también presentó diferencias significativas en suelos con arroz, siendo R5 la rotación con mayor actividad diferenciándose significativamente R2 y R3 pero no de R4 (Tabla 2).

Tabla 2: Actividades enzimáticas de los suelos bajo pradera o cultivo de arroz de las rotaciones R2, R3, R4 y R5.

Rotaciones	Actividades enzimáticas (ug/ g suelo seco/ h)							
	Deshidrogenasa (1)		Fosfatasa alcalina(2)		Fosfatasa acida(2)		FDA (3)	
	Suelo pradera	Suelo arroz	Suelo pradera	Suelo arroz	Suelo pradera	Suelo arroz	Suelo pradera	Suelo arroz
R2	ND	1,6 ns	ND	32,5 a	ND	441,3 a	ND	9,3 ns
R3	7,6 ns	2,2 ns	25,7 ns	36,8 a	180,2 ns	403,7 a	14,5 ns	10,2 ns
R4	11,4 ns	4,6 ns	21,9 ns	38,2 a	139,9 ns	506,6 ab	18,9 ns	7,8 ns
R5	5,7 ns	1,7 ns	29,2 ns	52,4 b	139,4 ns	578,2 b	19,0 ns	12,9 ns

(1) ug INT/g suelo seco/h; (2) ug p-nitrofenol/suelo seco/h;(3) ug fluoresceína/g suelo seco/h

Los valores representan la media de los tres bloques. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). ns indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos. R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

4.3 Recuento de grupos microbianas

En los suelos con pradera, el recuento de bacterias heterótrofas totales presentó diferencias significativas entre los tratamientos, siendo R4 la rotación con mayor número, diferenciándose significativamente de R3 y R5 (Figura 4). La abundancia del resto de los grupos microbianos evaluados no mostró diferencias significativas.

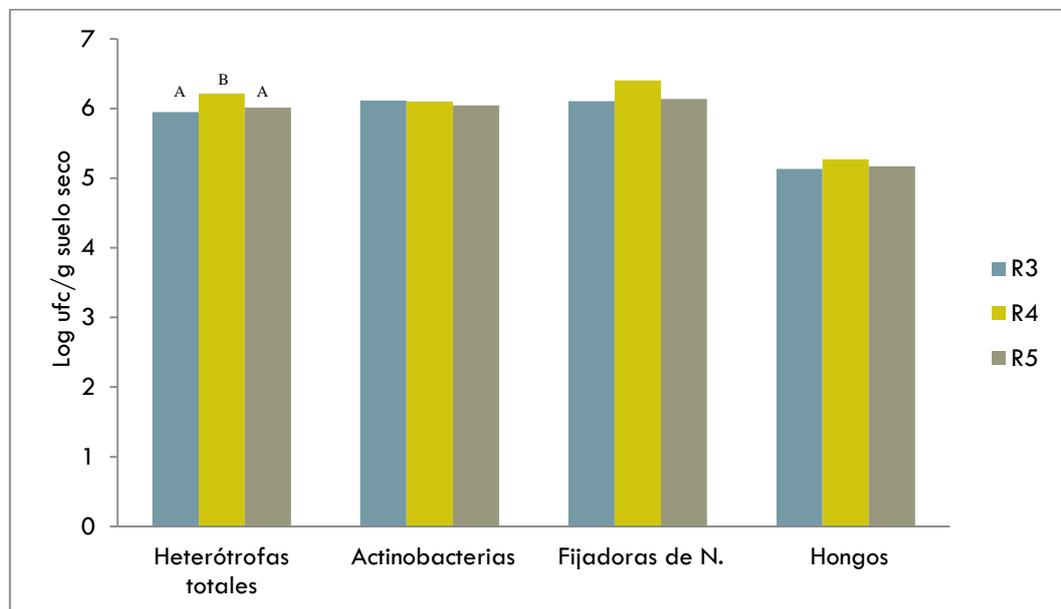


Figura 4. Recuentos de bacterias heterótrofas totales, Actinobacterias, Fijadores de Nitrógeno y Hongos en suelos de las rotaciones R3, R4 y R5 bajo praderas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

En los suelos bajo cultivo de arroz, el recuento de actinobacterias presentó diferencias significativas entre los tratamientos siendo R5 la rotación con mayor valor diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. A su vez, R4 y R5 se diferencian de R2 y R3 las cuales presentaron los menores valores (Figura 5). La abundancia del resto de los grupos no presentó diferencias significativas entre tratamientos.

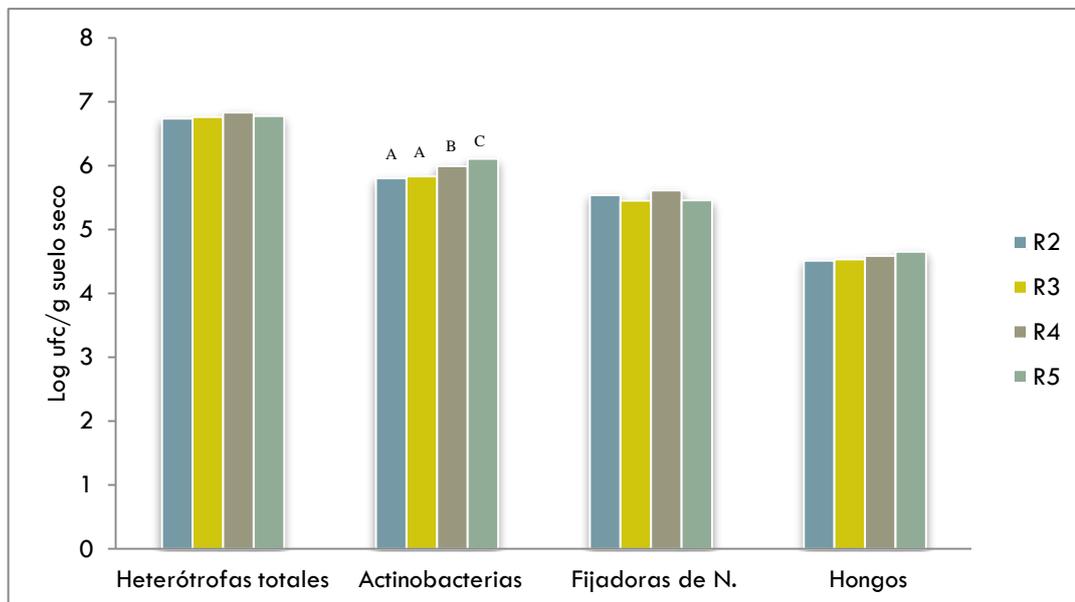


Figura 5. Recuentos de bacterias heterótrofas totales, Actinobacterias, Fijadores de Nitrógeno y Hongos en los suelos bajo cultivo de arroz de las rotaciones R2, R3, R4 y R5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

4.4 Potencial de inóculo micorrícico

El potencial de inóculo micorrícico de los suelos de las rotaciones arroceras se evaluó en un ensayo utilizando cebolla como planta trampa. Se determinó el porcentaje de micorrización total, de arbuscúlos y de vesículas. Las raíces de las plantas de cebolla desarrolladas en los suelos de las rotaciones arroceras presentaron entre el 66-76 % de colonización micorrícica sin diferencias significativas entre las distintas rotaciones (Tabla 3).

Se obtuvieron diferencias significativas entre rotaciones para la variable % de arbuscúlos. Las plantas de cebolla creciendo en el suelo de R5 presentaron mayor capacidad de formar arbuscúlos diferenciándose significativamente de las plantas del suelo de R3 y R4. El suelo de la R2 no se diferenció de ninguna de las rotaciones (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de micorrización total, por arbuscúlos y vesículas en plantas de cebolla crecidas en suelos de las rotaciones R2, R3, R4 y R5

Rotaciones	% Micorrización	% Arbúsculos	% Vesículas
R2	72,8ns	8,5ab	13,3ns
R3	76,2ns	7,7a	17,9ns
R4	70,1ns	6,2a	12,3ns
R5	65,9ns	13,9b	10,2ns

Los valores representan la media de los tres bloques Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). ns indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos. ns indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos. R2: arroz-cultivos; R3: arroz-pradera corta; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

4.5 Perfil metabólico de la comunidad microbiana

En el análisis de la respiración de la comunidad microbiana de los suelos de las rotaciones arroceras R2, R4 y R5 se utilizaron trece sustratos. A modo general se puede decir que la respiración se inhibe con serina como sustrato ya que los valores obtenidos fueron más bajos que los controles. Mientras que el ácido cítrico indujo los mayores valores de respiración. Solamente cuatro de los trece sustratos analizados pudieron diferenciar significativamente la respiración entre tratamientos (Tabla 4). La respiración con glucosa y con ácido glutámico fue menor en el suelo de la R2, que en el suelo de R4 y R5. Por otro lado, con el agregado de ácido fumárico e histidina, el suelo de la R5 presentó una mayor respiración diferenciándose significativamente del suelo de la R2, pero no del de la R4 (Tabla 4).

Tabla 4: Respiración inducida por sustratos de los suelos bajo cultivo de arroz de las rotaciones R2, R4 v R5.

Sustratos	Respiración ($\mu\text{g CO}_2 / \text{g suelo/h}$)		
	R2	R4	R5
Glucosa	583,7 a	1131,7 b	712 b
Manosa	434,7 ns	351 ns	619 ns
L- asparagina	2163,5 ns	1002,9 ns	3061,8 ns
L- arginina	1156,2 ns	903,1 ns	652,5 ns
Histidina	3399,0 a	4317,9 ab	5334,8 b
Serina	-166,9 ns	-104,6 ns	-119,5 ns
Ácido Glutámico	1588,0 a	2232 b	2494,1 b
Ácido Succínico	706,2 ns	947 ns	530,5 ns
Ácido DL Málico	25743,9 ns	25485,8 ns	25299,3 ns
Ácido Cítrico	37864,7 ns	40824,2 ns	39204,4 ns
Ácido L- ascórbico	9988,1 ns	10122,6 ns	10157,4 ns
Ácido Oxálico	3478,5 ns	3552,6 ns	4176,2 ns
Ácido Fumárico	1118 a	1838,1 ab	1565 b

Los valores representan la media de los tres bloques. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD Fisher $\alpha=0,05$). Ns indica que no hay diferencias significativas. . R2: arroz-cultivos; R4: arroz-pradera larga; R5: arroz-soja-pradera.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con los sustratos que mostraron diferencias significativas. A través de los primeros dos componentes se representa el 92 % de la variabilidad. El CP1 divide las muestras en dos grupos, uno formado por los suelos de las rotaciones R4 y R5 que toman valores positivos en el eje del CP1 y otro grupo formado por las muestras de suelo de la R2 que toman valores negativos en el CP1

(Figura 6). En la Figura 6 se puede observar que las 4 variables estuvieron mayoritariamente asociadas al CP1.

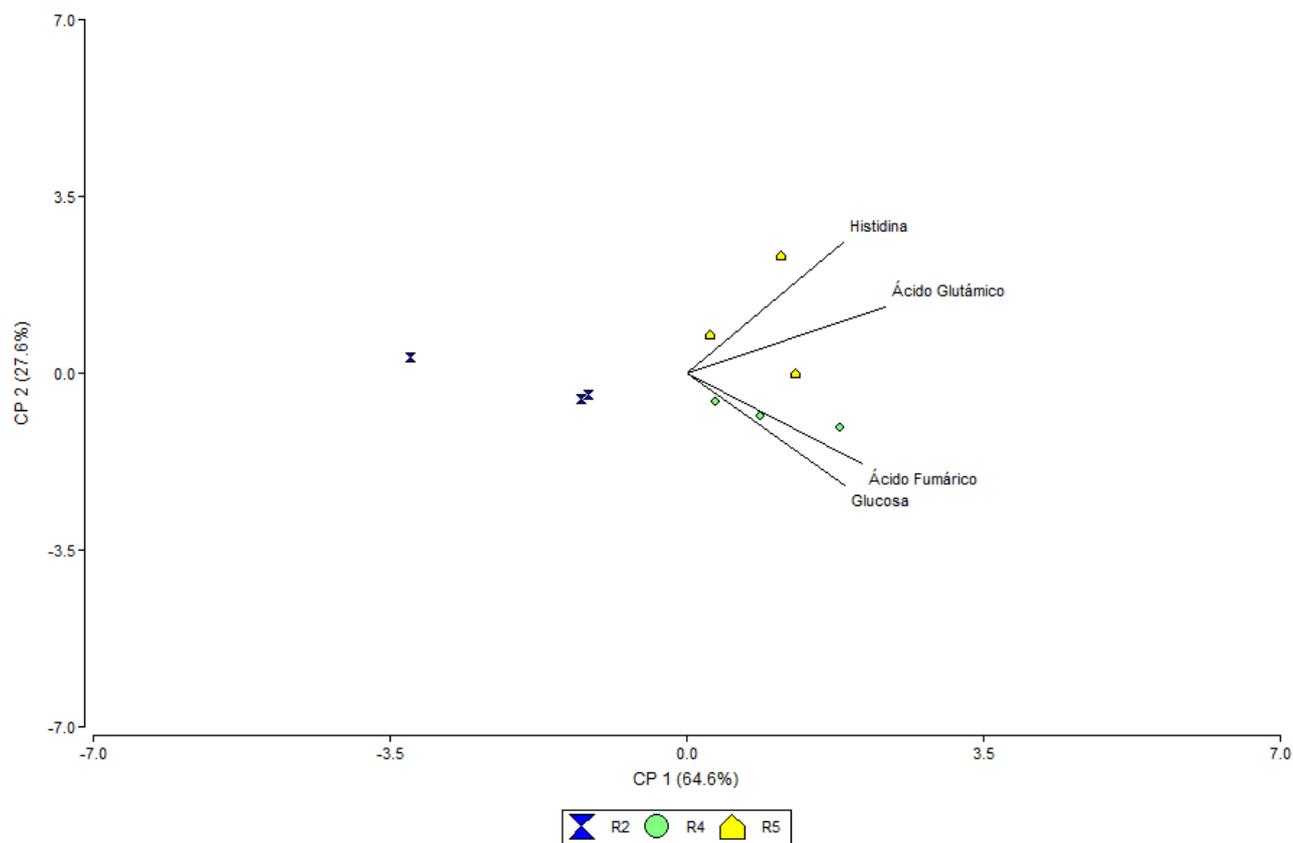


Figura 6. Biplot de la respiración inducida por los sustratos Glucosa, Histidina, Ácido Glutámico y Ácido Fumárico para los suelos bajo cultivo de arroz de las rotaciones R2 (arroz-cultivos), R4 (arroz-pradera larga) y R5 (arroz-soja-pradera)

4.6 Análisis de correlación de Pearson y componentes principales

Se realizó la correlación de las variables a través del Coeficiente de correlación de Pearson, para el muestreo de suelo con arroz (Tabla 5). El C de la biomasa microbiana se correlacionó positivamente con la fosfatasa alcalina y con el recuento de actinobacterias. La fosfatasa alcalina presentó correlación positiva con actinobacterias. La Fosfatasa ácida también se correlacionó positivamente con actinobacterias y con el recuento de hongos. Por último el % de arbusculos se correlaciona positivamente con el % de vesículas y con el % de micorrización. La respiración, la actividad deshidrogenasa y de hidrólisis de FDA no presentó correlaciones significativas con ninguno de los parámetros biológicos evaluados (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de Correlación de Pearson entre las variables biológicas evaluadas en suelos bajo cultivo de arroz de las distintas rotaciones.

	Resp	CBM	DH	F. alc	F. ac	FDA	Het	Actino	FN	Hongos	%Mic	%Arbus
Resp	-											
CBM	Ns	-										
DH	Ns	Ns	-									
F. alc	Ns	0,83	Ns	-								
F. ac	Ns	Ns	Ns	Ns	-							
FDA	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-						
Het.	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-					
Actino	Ns	0,67	Ns	0,61	0,68	Ns	Ns	-				
FN	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,79	Ns	-			
Hongos	Ns	Ns	Ns	Ns	0,64	Ns	Ns	Ns	Ns	-		
%Mic	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-	
%Arbús	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,65	Ns	Ns	-
%Vesíc	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,67	Ns

Respiración (Resp), C de Biomasa Microbiana (CBM), Deshidrogenasa (DH) Fosfatasa Alcalina (f. alc), Fosfatasa Ácida (F. ac.), FDA, Heterotrofas totales (Het.) Actinobacterias (Actino) Fijadoras de Nitrógeno (FN), Hongos, % Micorrización (% Mic.), %Arbúsculos (%Arbus.), % Vesículas (Vesíc.).

Se muestra el coeficiente de correlación para las variables con correlación significativa ($p < 0.05$). Ns indica que no hay diferencias significativas

El biplot del análisis de componentes principales para las variables que presentaron diferencias significativas en el muestreo de suelo bajo cultivo de arroz, muestran que el primer y segundo componente explican el 78 % de la variabilidad total (Figura 7 y 8). Este análisis mostró que las distintas intensidades de uso del suelo en las rotaciones ejercieron efecto sobre los parámetros biológicos evaluados. La Figura 7 muestra que R5 fue la rotación que mejor se diferencia del resto de los tratamientos, mientras que R2 y R3 son los tratamientos que menos lograron diferenciarse ya que las elipses de confianza se hayan altamente solapadas y R4 no se separa ni de R5 ni de R3, pero sí de R2. La Figura 8 muestra que la fosfatas alcalina y la biomasa microbiana se asocia mejor al CP1. Los vectores de las variables asociados al CP1 fueron similares

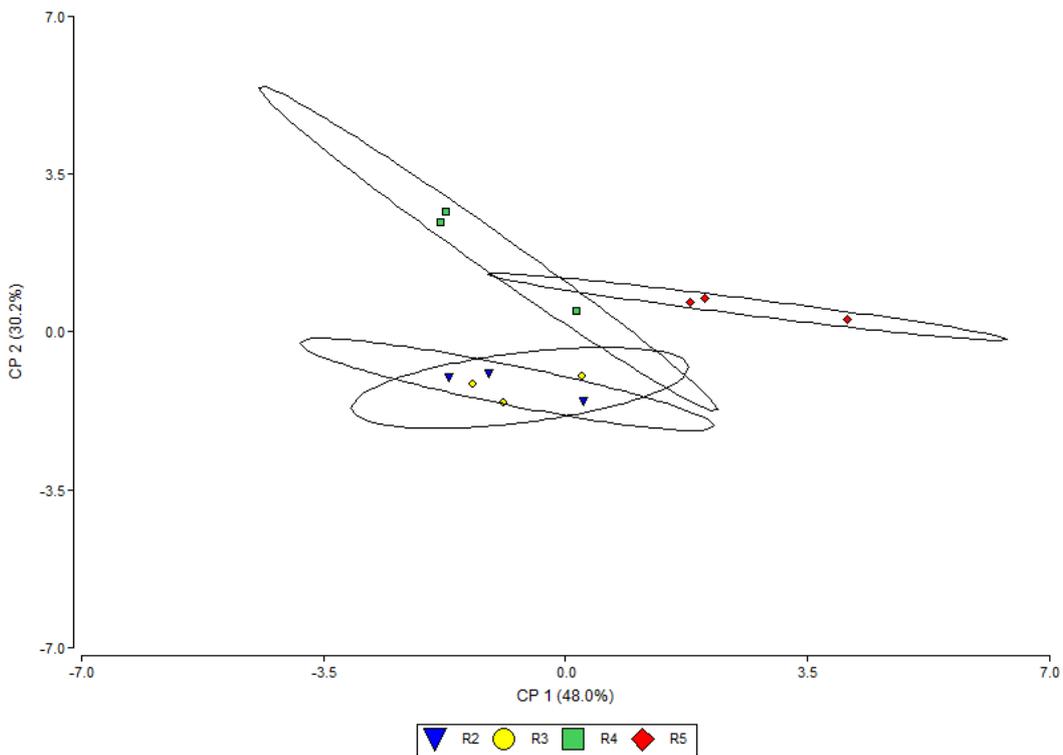


Figura 7. Análisis de componentes principales de las muestras de suelos de las rotaciones arroceras R2, R3, R4 y R5 utilizando las variables Respiración, C Biomasa microbiana, q CO₂, Fosfatasa ácida, Fosfatasa alcalina, recuento de actinobacterias y % Arbúsculos.

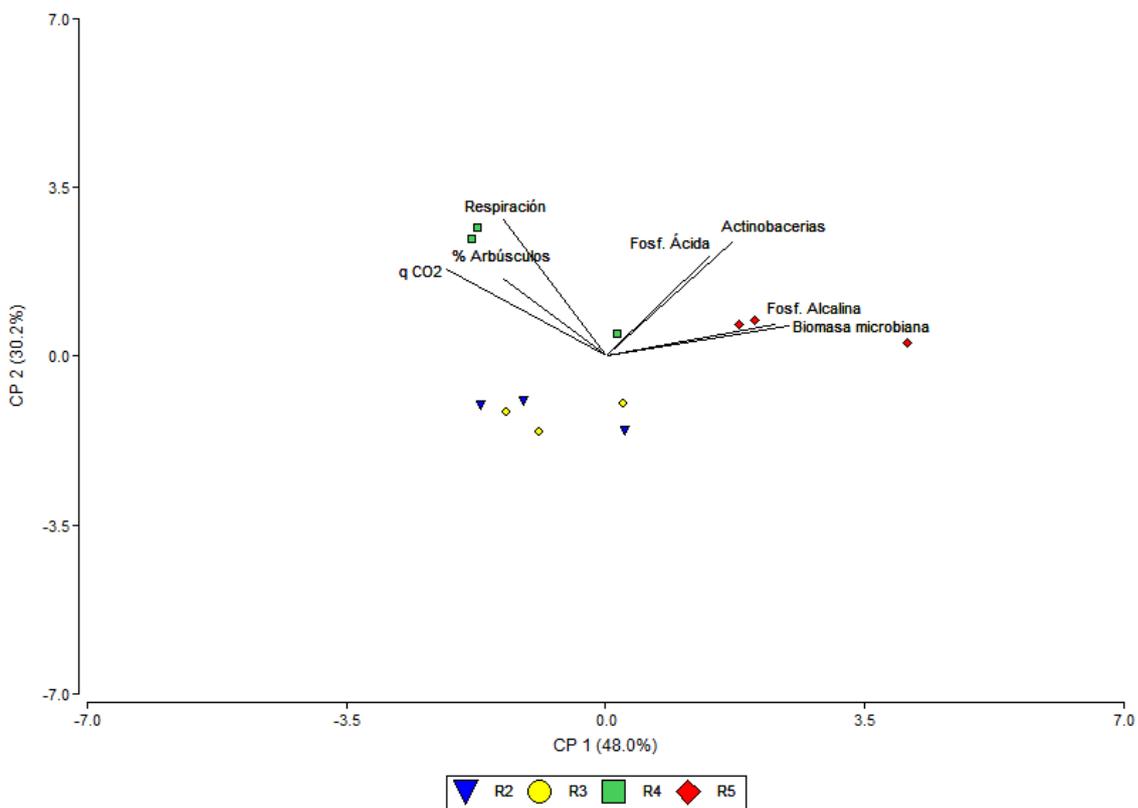


Figura 8. Biplot de las variables Respiración, C Boimasa microbiana, q CO₂, Fosfatasa ácida, Fosfatasa alcalina, actinobacterias y % Arbúsculos del muestreo de suelo con arroz.

4.7 Sensibilidad de las variables

En la figura 9 se muestra la sensibilidad relativa de las variables C- biomasa microbiana, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, recuento de actinobacterias y % de arbusculos, para diferenciar las rotaciones arroceras. La variable con mayor sensibilidad fue el C de la biomasa microbiana, con una diferencia de 47% entre las rotaciones R3 y R5, seguida del % de arbusculos que difirió un 45% entre los suelos de la R3 y R5. La fosfatasa alcalina mostró una diferencia de 38% entre R2 y R5, mientras que la fosfatasa ácida mostró una diferencia del 30% entre R3 y R5. La variable número de actinobacterias, fue la menos sensible, presentando una diferencia de 5% entre R2 y R5.

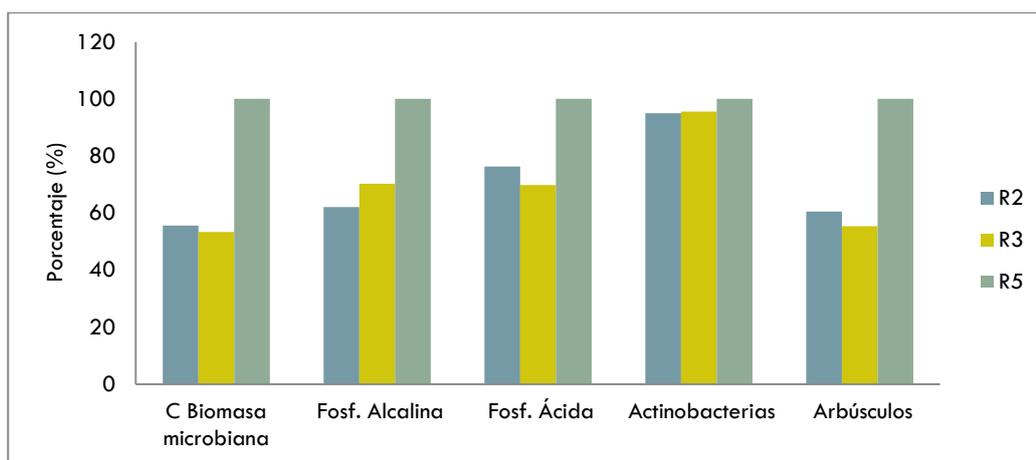


Figura 9. Sensibilidad relativa de las variables C Biomasa microbiana, Fosfatasa Alcalina (Fosf. Alcalina) Fosfatasa ácida (Fosf. Ácida) N° de Actinobacterias y % de Arbúsculos, para distinguir entre suelos bajo cultivo de arroz de las rotaciones R2 (arroz-cultivo), R3 (arroz-pradera corta) y R5 (arroz-soja-pradera)

5. Discusión

Tras la creciente intensificación de los sistemas de producción agrícola, se hace cada vez más necesario evaluar el impacto que estos modelos tienen sobre el suelo. Diversos trabajos se han dedicado a estudiar y determinar parámetros que den cuenta del impacto de la intensificación agrícola en el suelo.

En este trabajo, se evaluaron rotaciones de arroz con diferente grado de intensificación en el uso del suelo a través de diversos indicadores biológicos. Las muestras fueron tomadas del ensayo experimental “Paso de la Laguna”, perteneciente al INIA de Treinta y Tres. Se realizaron dos muestreos: el primero en primavera de 2014 donde los suelos estaban con pradera o pastura y el segundo en otoño 2015, donde los suelos se encontraban bajo cultivo de arroz. Este ensayo pertenece a una serie de Experimentos a largo plazo (ELP) del INIA que tiene como objetivo evaluar los impactos de los sistemas de producción sobre los recursos naturales. El ELP Paso de la Laguna fue instalado en 2012, se encuentra en la cuenca de la Laguna Merín donde se siembra más del 60% del arroz de Uruguay, dicho ELP se encuentra en las etapas de estabilización (Terra, 2017).

En los suelos bajo cultivos de praderas no se logró obtener diferencias significativas entre las rotaciones para los parámetros evaluados, excepto en el recuento de bacterias heterótrofas totales (Figura 4). Esto puede deberse a que en el momento del muestreo todavía no había pasado tiempo suficiente para evidenciar diferencias significativas entre las rotaciones. Hay que tener en cuenta también el efecto positivo de las pasturas sobre el suelo, ya que la cobertura vegetal protege de la degradación química y física del suelo (Franchini, 2007), y ayuda a estabilizar la biomasa microbiana del suelo (Benintende y Benintende, 1996).

En los suelos bajo cultivo de arroz, se obtuvieron diferencias significativas entre las rotaciones para algunos de los parámetros biológicos evaluados. Pese a que el ensayo fue instalado en 2012, y que las rotaciones que incluyen pradera recién completaron un ciclo en el momento del muestreo, algunos de los parámetros biológicos se vieron afectados ante la intensificación. A modo general, los parámetros biológicos pudieron separar las rotaciones más intensivas, R2 y R3 (que incluyen mayor proporción de arroz dentro del ciclo de rotación), de las menos intensivas, R4 y R5, las cuales incluyen tres y dos años de pradera respectivamente (Figura 7). Diversos trabajos han investigado acerca del efecto de las praderas y coberturas vegetales sobre el suelo. Acosta Martínez *et al.*, (2007), obtuvieron mayores valores de actividades enzimáticas y biomasa microbiana en suelos nativos o bajo pastura, comparado con sistemas agrícolas atribuyéndolo al impacto positivo de la cobertura vegetal, a los diferentes sistemas radiculares, a la secreción de sustancias estimulantes para la microbiota y a la ausencia de laboreo. Benintende (2008), también encontró mayores actividades en rotaciones de arroz que incluyen pasturas.

El efecto positivo de las rotaciones con pastura se atribuye a distintas causas, dentro de las cuales se encuentran: mayor aporte de N, mejora en la condición física del suelo y menores problemas sanitarios (Ernst y Siri, 2010). García Préchac *et al.*, (2004) plantea que la estabilidad de los agregados del suelo se incrementa luego de una inclusión de pasturas en rotación con cultivos, debido a que no existe laboreo durante el ciclo de pasturas y los sistemas radiculares promueven la agregación del suelo, ambos efectos se pierden luego del laboreo. Estas características hacen que la incorporación de periodos de pradera a los cultivos, contribuya a la estructura física y a la estabilidad microbiana del suelo. Esto se ve reflejado en los resultados, donde las rotaciones que incluyen varios años de pradera mostraron mayor biomasa microbiana y actividades enzimáticas que aquellas que solo incluyen pasturas anuales o praderas cortas.

Entre los indicadores biológicos evaluados, la biomasa microbiana resultó la variable con mayor sensibilidad para diferenciar entre los tratamientos (figura 8 y 9). La biomasa microbiana es un parámetro que hace referencia al componente biótico de la materia orgánica del suelo (Jenkinson y Ladd 1981), controla la descomposición y la liberación de nutrientes para otros organismos. También actúa como un reservorio de nutrientes y ayuda a mantener la sustentabilidad agrícola a largo plazo (Tripathi *et al.*, 2007). Es considerado un parámetro muy sensible que responde rápidamente a cambios en el uso del suelo (Ferrerías *et al.*, 2009).

El suelo de la R5 presentó mayores valores de carbono de la biomasa microbiana y se diferenció significativamente del resto de las rotaciones (Tabla 1). Estudios donde se evalúan diferentes tipos de intensificación agrícola también han mostrado al C de la biomasa microbiana como una de las variables más sensibles (Anderson y Domsch, 2010; Nogueira *et al.*, 2006, Zagal, *et al.*, 2009 y Mganga *et al.*, 2016). Dicho resultado puede estar dado por varios factores. Por un lado, esta rotación incluye dos años de pradera previos al cultivo de arroz. Trabajos anteriores han demostrado que la ausencia prolongada de laboreo durante este período genera estabilidad en el crecimiento y distribución de las poblaciones microbianas (Benintende y Benintende, 1996). Datos similares donde las rotaciones con pradera presentaron mayores valores de C biomasa microbiana se obtuvieron en estudios hechos en Entre Ríos, Argentina (Benintende, 2008). Otro factor importante que puede estar influyendo en el resultado es la cantidad y calidad de residuos vegetales suministrados por las leguminosas presentes en R5; esta rotación incluye además de pradera 2 años de cultivo de soja. Estudios realizados en regiones de China, donde se cultiva el arroz de manera intensiva mostraron que la incorporación de residuos de leguminosos en el suelo mejoró el contenido de nitrógeno y la biomasa microbiana (Yu *et al.*, 2013). Otros estudios también han evaluado como positiva la inclusión de leguminosas dentro de sistemas de cultivos, ya que incrementa el nitrógeno mineral en el suelo y reduce la presencia de malezas (Shafi *et al.*, 2007; Mazzoncini *et al.*, 2011).

Las rotaciones más intensivas, R2 y R3, que tienen mayor predominancia del cultivo de arroz, presentaron los valores de C biomasa microbiana más bajos. Quintero (2004) plantea que cuando aumenta el arroz en las rotaciones, la estabilidad del suelo y la

proporción de poros grandes en el suelo disminuye, lo que no favorece el buen desarrollo de los microorganismos. A dicha característica hay que agregar que estas rotaciones tienen período de pradera corta, a diferencia de R4 y R5 que poseen praderas más largas que como se mencionó anteriormente favorecen la recuperación del suelo y la estabilización de las poblaciones microbiana.

La respiración edáfica es un parámetro muy utilizado como indicador, representa el consumo de O_2 , o el desprendimiento de CO_2 realizado principalmente por microorganismos del suelo (Anderson 1982). En este trabajo la respiración presentó valores bajos no superando los 5 mg CO_2/g suelo/10 días lo que resulta esperable para suelos de arroz debido a la anaerobiosis a la que están sometidos. Igualmente R4 se diferenció del resto de los tratamientos presentando la mayor tasa de respiración (Tabla 1). Sin embargo, la respiración se considera un parámetro altamente variable y puede alterarse según la disponibilidad de sustratos, humedad y temperatura del suelo. Esto hace que la variable sea difícil de interpretar por si sola como indicador de calidad de suelo (Sanjurjo, 2009).

Uno de los parámetros utilizados que involucra a la respiración, es el qCO_2 . Dicho parámetro representa el coeficiente entre respiración y C Biomasa microbiana y refleja la eficiencia metabólica de la biomasa microbiana, ayudando a comprender los cambios químicos y biológicos que ocurren bajo diferentes prácticas agrícolas (Masto *et al.*, 2006). El suelo de R5 presentó el valor de qCO_2 más bajo diferenciándose significativamente de R4, el cual presentó el qCO_2 más alto (Tabla 1). En el caso de R5 estos datos podrían estar indicando que la comunidad microbiana es más estable y que para una cantidad de carbono orgánico metabolizable, la proporción de carbono respirado es baja, y por tanto mayor es el carbono asimilado (Aziz, 2011). Anderson y Domsch (2010) encontraron que aquellas rotaciones donde se alternan diversos cultivos presentan un qCO_2 más bajos que en monocultivos, lo cual coincide con los resultados de este trabajo, ya que las rotaciones R2 y R5 que alternaron otros cultivos presentan qCO_2 más bajo. Teniendo en cuenta que R4 fue una de las rotaciones con mayor biomasa microbiana, el alto valor de qCO_2 puede estar manifestando una menor eficiencia metabólica de los microorganismos, ya que se necesita una mayor energía de mantenimiento como respuesta a una baja disponibilidad de nutrientes o sustrato como el carbono orgánico (Agnelli *et al.*, 2001).

A partir del año 2016 se comenzó a evaluar en este ELP instalado en Paso de la Laguna el contenido de C y N orgánico, C y N de la materia orgánica particulada (MOP) y C y N asociado a la fracción mineral (tesis de maestría en curso Ing. Agr. Ignacio Macedo, comunicación personal). Los resultados preliminares muestran que no hay diferencias en el C y N orgánico entre las distintas rotaciones. Sin embargo, se detectaron diferencias en el C-MOP y N-MOP entre R2 y R4 (Ignacio Macedo, comunicación personal). Resultará de gran valor poder correlacionar los parámetros biológicos evaluados en este trabajo con los parámetros químicos que resulten de esta investigación.

Las distintas funciones de descomposición realizadas por los microorganismos heterotróficos representan un componente importante de la diversidad funcional

microbiana. Si dicha diversidad catabólica se reduce, hace que el suelo sea menos resiliente a la descomposición disminuyendo la salud del mismo (Chapman *et al.*, 2007). La diversidad catabólica del suelo se puede evaluar mediante medidas de la comunidad microbiana, como es la evaluación de perfiles funcionales (Ritz *et al.*, 2009). En el análisis de respiración inducida por múltiples sustratos (Multi SIR), únicamente cuatro de trece sustratos evaluados, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, y permitió a modo general separar la rotación más intensiva (R2) de las menos intensivas (R4 y R5) (Tabla 4 y Figura 6). Los datos obtenidos en la biomasa microbiana, se correlacionan con los del análisis Multi-SIR, ya que R2 presenta los valores más bajos de biomasa microbiana y perfiles de respiración, mientras que R4 y R5 presentan los valores más altos en ambos casos. Datos similares, se obtuvieron comparando suelos agrícolas con suelos forestales, los cuales se correlacionaron con la biomasa microbiana (Scotti *et al.*, 2015). Trabajos realizados en Sudáfrica, con el fin de investigar cómo el uso de la tierra afecta en el tamaño, la actividad y diversidad metabólica de la comunidad microbiana han demostrado que la mayor diversidad catabólica existe bajo pastizales nativos en comparación con bosques exóticos y monocultivos (Nsabimana *et al.*, 2004).

Entre las actividades enzimáticas evaluadas, las fosfatasas ácidas y alcalinas fueron las que mostraron diferencias significativas entre las rotaciones. Las fosfatasas son enzimas que participan en la mineralización del P orgánico, y su mecanismo de acción es básicamente extracelular. Pueden ser estabilizada en la materia orgánica del suelo, o en las partículas coloidales inorgánicas y liberada gradualmente cuando exista poca disponibilidad de iones fosfatos en el suelo (Krämer *et al.*, 2000)

En el caso de la fosfatasa alcalina R5 fue la rotación que obtuvo más actividad diferenciándose significativamente del resto. Teniendo en cuenta que R5 también presentó la mayor biomasa microbiana, este resultado evidencia la estrecha relación que existe entre las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana (Aon y Colaneri, 2001; Baum *et al.*, 2003). En el análisis de correlación de Pearson también se evidencia esta relación (Tabla 5).

En la actividad de fosfatasa ácida R5 también presentó la mayor actividad diferenciándose significativamente de R2 y R3. Al igual que en la fosfatasa alcalina, en esta actividad también se hace notoria la relación entre la biomasa microbiana y las actividades enzimáticas, ya que las rotaciones que presentaron mayor actividad fosfatasa son aquellas que tienen mayor biomasa microbiana (Tabla 1 y 2).

Si bien ambas fosfatasas mostraron ser sensibles a las diferentes rotaciones, la fosfatasa ácida presentó valores por encima de 400 $\mu\text{g/g}$ suelo seco/h, mientras que en la fosfatasa alcalina los valores no superaron los 60 $\mu\text{g/g}$ suelo seco/h. Datos similares donde la actividad fosfatasa ácida presenta valores altos respecto a la fosfatasa alcalina, fueron obtenidos en agroecosistemas del Cerrado Brasileño, mostrando ser las actividades enzimáticas más sensibles a prácticas agrícolas (Vinhai-Freitas, *et al.*, 2013). Esta magnitud en la actividad de la fosfatasa ácida puede estar relacionada al hecho de ser suelos de uso agrícola, donde la aplicación frecuente de fertilizantes disminuye el pH

del suelo (Liebig *et al.*, 2002) y lo hace más propicio para este tipo de fosfatasas. Varios estudios han demostrado que el pH del suelo, ejerce una importante influencia en la actividad de las fosfatasas (Nahas *et al.*, 1994b; Oberson *et al.*, 1996).

No se obtuvieron diferencias significativas con las demás actividades enzimáticas, llama la atención que la actividad deshidrogenasa no haya sido afectada por la intensificación en el uso del suelo. Se considera a la actividad deshidrogenasa como un indicador sensible que puede representar el tamaño y la actividad de la comunidad microbiana viable debido a que ésta actúa solamente en células vivas (Nannipieri, 1994). Esto se contradice con los resultados de C de biomasa microbiana, que si evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Hay trabajos donde dicha actividad si logro diferenciar distintos tipos de rotaciones (Zagal, 2009) y tratamientos del suelo (García-Gil, 2000).

Existen diferentes grupos funcionales de bacterias que son utilizados como indicadores de calidad de suelo. Generalmente estos grupos cumplen un rol importante en las funciones del suelo, y variaciones en los recuentos puede dar idea de que funcionalidades son más afectados por cambios en el uso del suelo. Dentro de los recuentos realizados, las actinobacterias lograron diferenciar los tratamientos, siendo R5 la que presentó mayor valor, seguida de R4, diferenciándose del resto de los tratamientos (Figura 5). Las actinobacterias representan un grupo de gran importancia ya que son bien conocidos por su extensa producción de compuestos con capacidad de solubilizar fosfatos (Gomes *et al.*, 2000; Hamdali *et al.*, 2008; Miyadoh, 1993). Además sus metabolitos secundarios, pueden influenciar en el desarrollo de la planta, produciendo hormonas vegetales, aumentando la disponibilidad de nutrientes y controlando patógenos rizósferos a través de la liberación de toxinas y antibióticos (Crawford, 1978; Hamdali, 2008; Miyadoh, 1993), por tanto la disminución de este grupo de organismos en el suelo, puede estar afectando dichas propiedades, deteriorando la calidad del mismo.

Las asociaciones benéficas que establecen las micorrizas con las plantas son también buenos indicadores de la calidad del suelo. La importancia los hongos micorrizicos radica en su capacidad para incrementar la adquisición de nutrientes beneficiosos para las plantas. Una de las principales funciones que cumplen dichos hongos es la de extender la superficie de absorción en el suelo a través de sus hifas, lo cual hace que las plantas micorrizadas incrementen la captación de absorber nutrientes minerales, particularmente fósforo (P) (Jayachandran y Shetty, 2003; Smith y Read, 2008) y algunos otros elementos poco móviles en el suelo. Dentro de la evaluación de micorrizas, el porcentaje de arbusculos mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos que presentaron mayor potencial para formar arbusculos fueron R5 y R2 (Tabla 3). Se ha demostrado que uno de los factores que influye sobre la micorrización es el contenido de P del suelo (Smith y Read, 2008). Es de destacar que el contenido de P en los suelos de las distintas rotaciones fue en promedio de 12 ppm y no presentó diferencias significativas entre las rotaciones (Ignacio Macedo, comunicación personal); por lo que este no sería el factor que explica las diferencias observadas en los resultados. Ambas rotaciones alternaron con otros cultivos aparte del arroz, en el caso de R2 se introdujo sorgo y soja, y

en R5 solamente soja. El tipo de cultivo influye en la colonización micorrizica, siendo los cultivos con mayor demanda de fosforo, como las leguminosas, o con un pobre sistema radicular, como las gramíneas los mas micorrizables (Azcon *et al.*, 1980). Por tanto, la presencia de soja y sorgo en estas rotaciones podría estar favoreciendo la cantidad de propágulos micorrizicos.

El porcentaje de arbusculos fue mayor en plantas crecidas en suelo de R5 comparado con R2. Si bien ambas rotaciones incluyen soja, en R5 es mayor la presencia de soja en el ciclo de rotación. Otro factor que puede estar influenciando, sumado a la presencia de soja en su ciclo, es que en R5 se incluyen dos años de pradera. Ha sido demostrado que la secreción de flavonoides de las leguminosas promueve el establecimiento de micorrizas arbusculares (Siqueira *et al.*, 1991). Estudios donde se utilizó alfalfa como modelo, mostró que dicha leguminosa aumentó la abundancia y diversidad de las micorrizas (Pivato *et al.*, 2007). Por otro lado, la ausencia de laboreo durante esos dos años puede haber posibilitado la permanencia de redes de hifas externas y de raíces colonizadas en el suelo haciendo que aumente el potencial infectivo en cultivos posteriores. Otros estudios han corroborado los efectos positivos que tiene la no labranza en el potencial micorrizico del suelo, y en el potencial infectivo para los siguientes cultivos (Colozzi-Filho *et al.*, 2001). Por último, hay que tener en cuenta que existen otros tipos de indicadores que no fueron abordados en este trabajo, pero han mostrado ser sensibles a cambios en el uso del suelo. Mganga *et al.*, (2016), detectaron en suelos del este africano, que las actividades enzimáticas B- glucosidasa, cellobihidrolasa y cintasa fueron mayores en sistemas naturales comparado con suelos agrícolas. Otros estudios han incorporado el análisis del metagenoma por medio de técnicas moleculares y comparaciones filogenéticas para conocer mejor la diversidad microbiana del suelo (Escalante *et al.*, 2004).

6. Conclusiones y perspectivas

A modo general se pudo cumplir con el objetivo de evaluar el impacto de la intensificación agrícola en sistemas arroceros a través de indicadores microbianos de calidad del suelo. Los resultados de este trabajo estuvieron de acuerdo con la hipótesis de trabajo propuesta, a pesar de que no todos los indicadores utilizados presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Hay que tener en cuenta que el ensayo de la estación experimental "Paso de la Laguna", donde se extrajeron las muestras, se encontraba en etapas de estabilización en el momento de los muestreos. La respiración y biomasa microbiana, las actividades de las enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas, el recuento de actinobacterias, el perfil metabólico de la comunidad microbiana y el potencial de inóculo micorrizico permitieron de forma temprana determinar diferencias entre suelos de rotaciones arroceras de intensidad contrastante.

Dentro de las rotaciones menos intensivas, la incorporación de soja en el sistema convencional de producción de arroz obtuvo mejores resultados en los parámetros evaluados, siendo R5 la rotación que se diferenció mejor de resto de los tratamientos. La presencia de esta leguminosa en rotación con arroz sin perder el período de pradera,

parece no afectar la calidad del suelo y podría ser una alternativa sustentable de intensificación agrícola. Sin embargo, la rotación de arroz con cultivos excluyendo las praderas o el arroz rotado con una pastura corta mostraron ser sistemas de intensificación que afectaron negativamente algunos parámetros biológicos del suelo.

Es importante destacar que, en Uruguay, no hay una línea de base de indicadores para ser utilizados en planes de monitoreo. Para que esto suceda, para cada indicador se tienen que establecer niveles en los que estas variables deberían fluctuar. Hay que tener en cuenta que los indicadores son válidos para un determinado tipo de suelo, ya que las características físicas y químicas de cada suelo pueden hacer variar los parámetros evaluados.

Establecer un conjunto mínimo de indicadores que permitan reflejar el estado del suelo y poder determinar niveles de referencia, es de suma importancia para poder realizar planes de monitoreo de calidad del suelo, lo que permitiría tener un seguimiento del impacto de las diferentes prácticas agrícolas, y predecir cambios futuros. Para establecer un conjunto mínimo de variables a analizar, es necesario explorar otros indicadores, y evaluar cuales son los que reflejan mejor los cambios en el uso del suelo.

Por último, no hay que dejar de lado los servicios ecosistémicos que brinda el suelo, su rol en la producción de alimentos combustible y fibras. Si no existe un manejo que se dirija hacia la conservación y mantenimiento de la calidad del suelo, muchos servicios se verían afectados y con él el desarrollo de las sociedades del mundo.

7. Anexo

7.1 Capacidad de campo

Para cada muestra:

- 1- Pesar 10 g de suelo en jeringa con gaza en el extremo inferior (peso inicial) (pesar jeringa sola previamente)
- 2- Poner la jeringa con el suelo sobre una servilleta.
- 3- Empapar el suelo
- 4- Dejar que la servilleta se seque
- 5- Pesar la jeringa con el suelo. Este valor corresponde al 100 % de la retención hídrica del suelo (peso 100%)
- 6- Hallar el coeficiente de humedad del suelo (Pesar 10 gramos de suelo, ponerlos a secar a 105°C durante 48 horas. Calcular la diferencia entre peso inicial y peso seco)

Cálculos

- 1-Restar peso de jeringa para peso inicial y peso 100%
- 2-Peso 100%- Peso seco= ml correspondientes a 100% de la capacidad de retención hídrica
- 3-Calcular los mL correspondientes a 75% de la capacidad de retención hídrica
- 4-Esos ml corresponden a la retención hídrica de 10g, calcular para 50g
- 5- A esos ml restarle el peso correspondiente a Peso inicial- peso seco, que correspondería a los ml de agua que ya tiene la muestra.

7.2 Respiración microbiana

Cálculos

$\text{mg CO}_2/\text{g suelo}/10 \text{ días} = [(\text{GB}-\text{GM}) \times \text{N}(\text{HCL}) \times 6 \times \text{hx}100] / \text{peso seco de la muestra}$

GB= gasto de blanco

GM= gasto de la muestra

h = coeficiente de humedad

N= normalidad

6= equivalente en carbono del HCL

7.3 Carbono de biomasa microbiana

Cálculos

$\text{mg C-CO}_2 = (\text{mg C-CO}_2 \text{ suelo fumigado} - \text{mg C-CO}_2 \text{ suelo no fumigado}) / 0,45$
0,45= constante que representa fracción de biomasa microbiana que se mineraliza durante 10 días a 28°C

7.4 Actividades enzimáticas

7.4.1 Actividad de deshidrogenasa

Preparación de soluciones

- **Buffer Tris 1M, pH=7:** Mezclar 12,152 g de tris en 50 ml de agua destilada. Ajustar pH con HCl 0,5 M. Llevar a volumen final de 100 ml.
- **Solución sustrato:** disolver 500 mg de INT en 2 ml de N-n- dimetilformamida (en cámara de gases), llevar a 100 ml con agua destilada.

Curva Patrón

Standard stock 100µg INTF/ml. Se emplea acetona como solvente. Preparar 50 ml

Tomar fracciones de 1ml, 500ul, 250ul, 100ul, completar hasta llegar a 13,5ml con acetona

100ul..... 10ug/ml

250ul.... 25ug/ml

500ul.....50ug/ml

1000ul....100ug/ml

Cálculo de actividad

La actividad se calcula mediante la siguiente ecuación

$\mu\text{g de INTF h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco} = [(X-C) \cdot \text{coeficiente de humedad}] / 2$

X= µg INTF de la muestra

C= µg INTF del control

2= horas de incubación

7.4.2 Actividad de fosfatasas acidas y alcalinas

Preparación de soluciones

Buffer, solución stock:

- 12,1 g de tris
- 11,6 g de ácido maleico
- 14,0 g de ácido cítrico monohidratado
- 6,3 g de ácido bórico
- 500 ml de NaOH 1 M
- Agua destilada hasta 1000ml

Buffer fosfatasa acida (pH 6,5)

Preparar 250 ml: 50 ml de solución stock, 100 ml de agua destilada. Ajustar pH con HCl 0,5 N, llevar a volumen de 250ml (en matraz aforado)

Buffer fosfatasa alcalina (pH 11)

Preparar 250 ml: 50 ml de solución stock, 100 ml de agua destilada. Ajustar pH con NaOH 0,5 N llevar a volumen de 250ml (en matraz aforado)

Sustrato fosfatasa acida

Preparar 50 ml: disolver 0,2134 g de p-nitrofenil fosfato en buffer para fosfatasa acida, llevar a un volumen de 50 ml.

Se prepara en el momento a utilizar

Sustrato fosfatasa alcalina

Preparar 50 ml: disolver 0,2134 g de p-nitrofenil fosfato en buffer para fosfatasa alcalina, llevar a un volumen de 50 ml.

No se conserva en heladera, se debe preparar cada vez.

Curva patrón

Solución madre

- Preparar solución de 1 mg p-nitrofenol/ ml (en matraz aforado)

Solución standard stock

- Tomar 1 ml de la solución madre y llevar a un volumen de 50 con agua destilada

0 ug/ml... blanco (1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M + 5 ml de agua).

10 ug/ml... 0,5 ml solución standard + 4,5 ml de H₂O + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

20 ug/ml... 1 ml solución standard + 4 ml de H₂O + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

40 ug/ml... 2 ml solución standard + 3 ml de H₂O + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

60 ug/ml... 3 ml solución standard + 2 ml de H₂O + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

80 ug /ml... 4 ml solución standard + 1 ml de H₂O + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

100 ug/ml... 5 ml solución standard + 1ml de CaCl₂ 0,5M + 4ml de NaOH 0,5 M

Cálculo de la actividad

La actividad se calcula mediante la ecuación

$$\mu\text{g p- nitrofenol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco} = (x-c)h$$

x= $\mu\text{g p- nitrofenol de la muestra}$

c= $\mu\text{g p- nitrofenol del control}$

h= coeficiente de humedad

7.4.3 Hidrólisis FDA

Preparación de soluciones

Buffer fosfato (pH 7,6)

Mezclar 217,5 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M y 32,5 ml de NaH₂PO₄ 0,2 M y llevar a 500ml con agua destilada.

Diacetato de fluoresceína

Solución de 2 mg/ml. Guardar a -20 envuelta en papel aluminio.

Standar de Fluoresceína

Diluir 0,1 g de sal disodica de fluoresceína en 50 ml de agua, luego agregar 50 ml de acetona. Guardar a -20° C envuelta en papel aluminio.

Curva patrón

- Preparar solución hija estándar de fluoresceína (1/10): 1 ml de sol. estándar de fluoresceína en 9 ml de buffer fosfato
- Tomar fracciones de 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 3; 4; 5 ml de solución hija

0 ug/ml... 0

0,5 ug/ml...0,05ml

1 ug/ml...0,1ml

1,5ug/ml...0,15ml

2,5ug/ml...0,25ml

5ug/ml...0,5ml

10ug/ml...1ml

30ug/ml...3ml

Completar volumen (10ml) con mezcla 1:1 de acetona y buffer fosfato

Cálculo de la actividad

$(X_{\text{ug/ml}} \cdot 20 \text{ml} \cdot \text{factor de humedad}) / (1 \text{g suelo} \cdot 2 \text{hs})$

7.5 Perfil metabólico de la comunidad microbiana

Cálculo

$(\mu\text{g CO}_2 / \text{g suelo/h} = ((\text{RM} - \text{RC}) \cdot 26) / 5) \cdot h.$

RM= Respiración de la muestra

RC= Respiración del control

h= Coeficiente de humedad

7.6 Medios de cultivo para recuentos microbianos

Medio para actinobacterias

SCA	
Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
CaCO ₃	0,02 g
KNO ₃	2,0 g
NaCl	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄	0,001 g
Agar	15 g
Agua destilada csp	1 L
pH	8

Medio para Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

LG	
Sacarosa	20 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
FeCl ₃	0,01 g
Azul Bromotimol (0,5% en etanol)	2 mL
CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Agua destilada csp	1 L
pH	6,8

8. Bibliografía

- Acosta-Martínez, V., Mikha, M. y Vigil, M. F. (2007). Microbial communities and enzyme activities in soils under alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. *Applied Soil Ecology*, 37, 41–52.
- Adriaanse, A. (1993) Environmental policy performance indicators. A study on the development of indicators for environmental policy in the Netherlands. Sdu Uitgeverij Koninginnergrach, The Netherlands.
- Agnelli, A., Ugolini, F. C., Corti, G. y Pietramellara, G. (2001). Microbial biomass C and basal respiration of fine earth and highly altered rock fragments of two forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 613-620.
- Alef, K. (1995). Soil respiration. En *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Ediciones de Academic Press, San Diego. 214-218.
- Anders, M. M. y Hignight, J. A. (2010). Environmental impact, soil quality, grain yield, and the economic viability of a rice-soybean rotation. En: R.J. Norman and K.A.K. Moldenhouer. Ediciones University of Arkansas Agricultural, Experiment Station, 237-247.
- Anderson, J. P. (1982). Soil respiration. En: *Methods of soil analysis: Chemical and Microbiological properties*. Editores, American Society of Agronomy. Wisconsin, USA, 831-87.1
- Anderson, T.H. and Domsch, K.H. (2010) *Soil Microbial Biomass: The Eco-Physiological Approach*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 2039-2043.
- Aon, M.A., Cabello, M.N., Sarena D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L., y Cortassa, S. (2001). Saptio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18, 239-254
- Astier, Marta., Maass M. y Etchevers J. (2002). Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. *Agrociencia*, 36(5), 605-620
- Azcon-Aguilar, C. y Barea J. (1980). "Micorrizas". *Investigación y Ciencia*, 47, 8-16.
- Aziz, I., Ashraf, M., Mahmood, T. y Islam, K.R. (2011). Crop rotation impact on soil quality. *Pakistan Journal of Botany* 43(2), 949-960
- Baltruschat, H., y Dehne. H. W (1988). The occurrence of vesicular arbuscular mycorrhiza in agro-ecosystems. Influence of continuous monoculture and crop rotation, green manure and nitrogen fertilization in inoculum potential with winter wheat. *Plant and Soil*, 107, 279-284.
- Baum, C., P Leinweber y Schlichting A. (2003). Effects of chemical conditions in re-wetted peats temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology* 22, 167-174.
- Benintende, S. y Benintende M.C. (1996). Biomasa microbiana en praderas en rotación agrícola ganadera fertilizadas con fósforo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 26, 93-99.
- Benintende, S., Benintende, M., Sterren, M., Saluzzio, M. y Barbagelata, P. (2015). Biological variables as soil quality indicators: Effect of sampling time and ability to classify soils by their suitability. *Ecological Indicators*, 52, 147-152.
- Benintende, S., Benintende M.C., Sterren, M.A. y De Batista, J.J. (2008) .Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. *Ecological Indicators*, 8, 704-708.
- Biswas, S., Hazra, G.C., Purakayastha T.J., Saha, N., Mitran, T., Roy, S. S., Basak, N. y Mandal, B. (2016). Establishment of critical limits of indicators and indices of soil quality in rice-rice cropping systems under different soil orders. *Elsevier. Geoderma*, 292, 34- 48

- Bozzo de Brum, M. A. (2010). Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros biológicos del suelo. (Tesis Maestría en Ciencias Ambientales) UDELAR-PEDECIBA Montevideo, Uruguay
- Brejda, J. J., Moorman T. B., Smith J. L., Karlen D. L., Allan D. L., y Dao T. H. (2000). Distribution and Variability of Surface Soil Properties at a Regional Scale 1 Mention of a specific trade name or product does not necessarily mean the endorsement of the USDA-ARS. *Soil Science Society of America Journal* 64, 974-982.
- Bueno dos Reis, F. y Carvalho Mendes, I. (2007). Biomasa microbiana do solo. Embrapa Cerrados Documento 205.
- Caldwell, B. A. (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiología*, 49, 637-644.
- Chalar, G. (2006). Dinámica de la Eutrofización a Diferentes Escalas Temporales: Embalse Salto Grande (Argentina-Uruguay). *Eutrofização Na América do Sul: Causas, Conseqüências e Tecnologias de Gerenciamento e Controle*, 87-101.
- Chapman, S.J., Campbell C.D, y Artz R.R. (2007). Assessing CLPPs using MicroResp. *J. Soils Sediments* 7, 406–410.
- Colozzi Filho, A., Andrade, D.S y Balota, E.L. (2001). Atividade microbiana em solos cultivados em sistema plantio direto. *Informe Agropecuário*, 22, 84-91.
- Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S. y Potts, J.M.(2003). A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology* . 69, 3593–3599
- Carpa, R. (2009). Enzymological research on soils from different environments. *Annals of the Romanian Society for cell Biology*, 16(1),44-48.
- Carter, M. R. y Stewart, B.A., (1996). *Structure and Organic Matter Storage in Agricultural Soils*. CRC Press, London
- Castillo, J; Bonilla, F; Lucas, T; Amaral, R y Terra, J. 2013. La integración del cultivo de soja a la rotación arroz-pastura en el este. *Revista Arroz*, 73, 6-39
- Colozzi Filho, A., Andrade, D.S. y Balota, E.L. (2001) Atividade microbiana em solos cultivados em sistema plantio direto. *Informe Agropecuário*, 22,84-91
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Editorial Paraninfo, España. 416 .
- Crawford, D.L. (1978). Lignocellulose decomposition by selected streptomyces strains. *Applied Environmental Microbiology*, 35,1041-1045.
- De La Fuente, E. y Suárez, S.A. (2008). *Agricultura y Problemas Ambientales*. In:Asociación Argentina de Ecología. *Ecología Austral*, 18, 239-252.
- Deambrosi, E. (2003). El sistema de producción de arroz en Uruguay y su sustentabilidad. En: *Resúmenes 3^{er} Conferencia Internacional de Clima Templado*, Punta del Este.
- Degens, BP & Harris, JA (1997). Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*., 29: 1309-1320.
- Dick, W.A. y Tabatai, M.A. (1993). Significance and potencial uses of soil enzymes. *Soil Microbial Ecology Meeting*., 95-127.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). (2017). Resultados de la Encuesta de Arroz "Zafra 2016/17" Recuperado de: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/diea-presenta-los-resultados-de-la-encuesta-de-arroz-zafra-2016-17>
- Doran, J.W. (2002). Soil health and global sustainability: translating science into practice. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 119–127

- Doran, J.W., y Parkin T.B. (1994). Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Science Society of America, Special Publication, 35, 3-21.
- Doran, J. W. y Safley, M. (1997). Defining and assessing soil health and sustainable productivity. En: Pankhurst, C., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. *Ediciones Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, Wallingford, Oxon.1–28.
- Eguren, G. (2005). Recursos naturales: Base Para el Sustento de las Sociedades Humanas. Proyecto SUMA, CUDECOOP, 9pp.
- Ernst, O. y Siri Prieto, G. (2010). Manejo del suelo y rotación con pasturas; efecto sobre la calidad del suelo, el rendimiento de los cultivos y el uso de insumos. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 45, 22-26.
- Ernst, O. y Siri-Prieto, G. (2011). La agricultura en Uruguay: su trayectoria y consecuencias. *II Simposio Nacional de Agricultura*, 149-163
- Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A. y Bolívar, F. (2004) Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas . *Agrociencia*, 38 [Fecha de consulta: 17 de diciembre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238602>> ISSN 1405-3195
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004). 28ª CONFERENCIA REGIONAL DE LA FAO PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/MEETING/007/J1225s/J1225s00.HTM>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004a) FAOSTAT data. FAO, Rome, <http://apps.fao.org>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004b) Forests and floods: Drowning in fiction or thriving on facts. Draft, FAO, Rome
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2015). El suelo es un recurso no renovable su conservación es esencial para la seguridad alimentaria y nuestro futuro sostenible I4373S/1/02.15 Ferreras, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernandez, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V. y Beltrán, C. (2009) Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *ResearchGate, Asociacion Argentina de Ciencias de suelo*, 27(1), 103-114.
- Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters . *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88:169-174
- Franchini, J. C., Crispino, C.C., Souza, R. A., Torres, E. y Hungria, M. (2007). Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in southern Brazil. *Soil and Tillage Research*, 92,18-29.
- Frioni, L. (2006). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola.*, Editorial de la Facultad de Agronomía, Montevideo
- Frioni, (2011). *Microbiología : básica, ambiental y agrícola.* Orientación Gráfica Editora SRL. Buenos Aires, Argentina. 744 pp
- García-Gil J.C., Plaza C., Soler-Rovira P. y Polo A. (2000). Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 1907–1913
- García-Préchac, F., Ernst, O., Siri, G. y Terra, J.A. (2004). Integrating no-till into crop-pasture rotations in Uruguay, Review. *Soil & Tillage Research*, 77(1), 1-13.
- Gil-Stores, Trasar-Cepeda, C., F., Leirós, M.C. y Seoane, S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 877-887

- Garland, J. y Mills, A. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of pattern of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2351–2359.
- Goldewijk, K. (2001). Estimating global land use change over the past 300 years: The HYDE Database, *Global Biogeochemical Cycles*, 15(2), 417–433
- Gomes, R., Semedo, L., Soares, R., Alviano, C., Linhares, L. y Coelho, R.. (2000). Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 146-150.
- Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.J. y Ouhdouch, Y. (2008). Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology*, 38, 12-19.
- Jayachandran, K. y Shetty, K. G. (2003). Growth response and phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizae of wet prairie sawgrass. *Aquatic Botany*, 76, 281–290.
- Jenkinson, D. S. y Ladd J. N. (1981). Microbial biomass in soil; measurement and turnover. In *Soil Biochemistry*, 5, 415-471.
- Jenkinson, D. S. y Powlson, D. S. (1976). *Soil Biology y Biochemistry*, . 8, 209-213
- Kandeler, E. y Dick, R. (2007). Soil Enzymes: Spatial Distribution and Function in Agroecosystems. En: *Biodiversity in Agricultural Production Systems*. Edicion Taylor & Francis Group, Florida, Estados Unidos. 263-79.
- Kandeler, E., Palli, S., Stemmer, M. y Gerzabek, M.H. (1999). Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle size fractions. *Soil Biology y Biochemistry*, 31, 1253–1264.
- Krämer, S. y Green, D. (2000). Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationships to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biology y Biochemistry*, 32:179-188.
- Lambin, E., Helmut, G. (2006). *Land-use and land-cover change: local processes and global impacts*. Springer Berlin Heidelberg, New York.
- Larson, W.E. y Pierce, F.J. (1991). Conservation and enhancement of soil quality. 175-203. In: *Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World*, Vol. 2: Technical papers. Bangkok, Thailand: International Board for Research and Management, 1991. IBSRAM Proceedings No. 12(2).
- Liebig, M. A., Varvel, G. E., Doran, J. W. y Wienhold, B. J. (2002). Crop sequence and nitrogen fertilization effects on soil properties in the western corn belt. *Soil Science Society of America Journal*, 66, 596-60.
- Masto, R.E., Chhonkar, P.K., Singh, D. y Patra, A.K. (2006). Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biology y Biochemistry*, 38, 1577–1582.
- Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A. G. y Swift, M. J. (1997). *Agricultural Intensification and Ecosystem Properties*. *Science*, 277, 504-509.
- Mazzoncini, M., Sapkota, T. B., Barberi, P., Antichi, D. y Risaliti, R. (2011). Long term effect of tillage, nitrogen fertilization and cover crops on soil organic carbon and total nitrogen content. *Soil Tillage Research*, 114, 165– 174. Mganga, K. Z., Razavi, B. S. y Kuzyakov, Y. (2016) Land use affects soil biochemical properties in Mt. Kilimanjaro region. *Journal Elsevier Catena*, 141, 22-29.
- Miyadoh, S. (1993). Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. *Actinomycetologica*, 7, 100-106.
- Moormann, T. N. y Reeves B. (1979). The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. *American Journal of Botany*, 66: 14-18.
- Muscolo, A., Panuccio, M. A., Mallamaci, C. y Sidari, M. (2014). Biological indicators to assess short-term soil quality changes in forest ecosystems. Elsevier. *Ecological indicators*, 45, 416- 423

- Nahas, E. (2002). Soil microorganisms phosphatase producers in different agricultural systems. *Bragantia*, 61(3), 267-275.
- Nahas, E., Centurion, J. F., y Assis, L. C. (1994b). Efeito das características químicas dos solos sobre os microorganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Recista Brasileira de Ciências do Solo*, 18, 49-53.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Nogueira, M.A., Albino, U. B., Brandao, O., Braun, G., Cruz, M. F., Dias, B. A., Duarte, R. T. D., Gioppo, N. M. G., Menna, P., Orlandi, J. M., Raimam, M. P., Rampazo, L. G. L., Santos, M. A., Silva, M. E. Z., Vieira, F. P., Torezan, J. M. D., Hungria, M. y Andrade, G. (2006). Promising indicators of assessment of agroecosystem alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil, *en Agriculture, Ecosystems and Environment*, 115, 237-247.
- Nsabimana, D., Haynes, R. J. y Wallis, F. M. (2004). Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Applied Soil Ecology.*, 26(1). 81-92
- Oberson, A., Bessonm, J. M., Maire, N. y Sticher, H. (1996). Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. *Biology Fertility of Soils*, 21, 138-148.
- Orwin, K. H., Wardle, D. A. y Greenfield, L. G. (2006). Ecological consequences of carbon substrate identity and diversity in a laboratory study. *Ecology* 97, 580-593.
- Paul, E. A. y Clark, F. E. (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, 275.
- Pivato, B., Mazurier, S., Lemanceau, P., Siblot, S., Berta, G., Mougél, C. y Van Tuinen, D. (2007). Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist Journal*, 176, 197–210.
- Quintero, C.E., Wilson, M., Paz Gonzalez, A., Vidal Vásquez, E., Díaz, E. y Cerana, J. (2004). Utilización de indicadores para evaluar el efecto del uso arrocero sobre la calidad del suelo. XIX Congreso Argentino de Ciencias de suelo, y II Simposio Nacional de Suelos Vertisolicos, , Entre Ríos, Argentina
- Raiesi, F. (2007). The conversion of overgrazed pastures to almond orchards and alfalfa cropping systems may favor microbial indicators of soil quality in Central Iran. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121, 309-318
- Ramankutty, N., y Foley, J. A. (1999). Estimating historical changes in global land cover: croplands from 1700 to 1992. *Global Biogeochemical Cycles* 13(4), 997-1027.
- Richards, J. F. (1990). Land transformation. In: Turner BL II, Clark WC, Kates RW, Richards JF, Mathews JT, Meyer WB (eds) *The Earth as transformed by human action: Global and regional changes in the biosphere over the past 300 years*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 163–178
- Ríos-Velázquez, C., Curbalo, D., Falto, L., González, L., Negrón, C., Pérez, C., Santiago, J., Torres, L. y Velázquez, A. (2008). *Deshidrogenasas*. Departamento de Biología. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Magagüez. Puerto Rico. Recuperado de <http://www.slideshare>.
- Ritz, K., Black, H. I. J., Campbell, C. D., Harris, J. A. y Wood, C. (2009). Selecting biological indicators for monitoring soils: a framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* 9, 1212–1221.
- Rodrigues de Lima, A.C., Hoogmoed, W.B., Brussaard, L., (2008). Soil quality assessment in rice production systems: establishing a minimum data set, en: *J. Environ. Qual.*, 37:623-630

- Roper, M .M. y Ophel-Keller K.M. (1997). Soil microflora as bioindicators of soil health, in: Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R. (Eds.), Biological indicators of soil health, . 157–177.
- Sanjurjo, L. (2009). Actividad y diversidad microbiana del suelo bajo distintas intensidades de uso. (Tesis Maestría en Ciencias Biológicas) UDELAR-PEDECIBA- – Montevideo, Uruguay
- Santruckova, H., Vrba, J., Picek, T. y Kopacek, J. (2004) Soil biochemical activity and phosphorus transformations and losses from acidified forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*,36,1569–1576
- Schinner, F. Olingher, R., Kandeler, E. y Margesing, R. (1996).Methods in Soil Biology. Springer, Germany, 426.
- Scotti, R., Iovieno, P. y Zaccardelli, M. (2015). Comparative assessment of microbial activity and biomass. Springer-Verlag Berlin Heidelberg *Biology and Fertility of Soils*, 51, 1013–1019
- Shafi, M., Bakht, J., Jan, M. T. y Shah, Z. (2007). Soil C and N dynamics and maize yield as affected by cropping systems and residue management in North-western Pakistan. *Soil Tillage Research*, 94, 520–529
- Schlöter, M., Dilly O. y Muncha, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 255–262.
- Siqueira, J. O., Nair, M.G., Hammerschmidt, R. y Safir, G. R. (1991). Significance of phenolic compounds in plant-soil microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, 10, 63-121.
- Smith, S. E. y Read D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academia Press. 605.
- Smith S. E, Read D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Editado: Academic Press. Londres , 787.
- Sparling, G. P. (1992). Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, 30,195-203.
- Stotzky, G. (1997). Soil as an environment for microbial life. En: *Modern Soil Microbiology*. Editores: Van Elsas, J. D., Wellington, E. M. H. y Trevors, J. T. Dekker, New York 1–20.
- Suarez, Y. (2010). Análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de papa criolla (*solanum phureja*) mediante una aproximación metagenómica. (Tesis Maestría en Microbiología). Universidad Nacional de Colombia.
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil enzymes. En: *Methods of soil analysis. Parte 2. Microbiological and biochemical properties*. Editores: Weaver, R. W., Angle, S. Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A. y Wollum, A. . Soil Science Society of America, Madison. 775–833
- Tarlera, S., Pereira V. y Fernandez, A. (2009). Emisiones de metano y óxido nitroso en la rotación arroz pastura. En: *Emisiones de metano y oxido nitrosos: principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario de Uruguay*. Ediciones CSIC, Udelar. Montevideo. 69-79
- Terra, J. (2017). Experimentos de Largo Plazo como Plataforma Agroambiental para la Intensificación Sostenible. *Revista INIA*, 48, 67-72.
- Terra, J., Castillo J., Bonilla F., Amaral R., Lucas T. y Macedo I. (2014). Soja en Sistemas Arroceros. Recuperado de <http://www.aca.com.uy/wp-content/uploads/2014/09/Soja-en-sistemas-arroceros.pdf>
- Theron, J. y Cloete, T. E. (2000). “Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments,” *Critical Reviews in Microbiology*, 26(1), 37–57..

- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A. y Øvreås, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*, 64, 53-62.
- Torsvik V. y Øvreås, L. (2002). "Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems," *Current Opinion in Microbiology*, 5, (3), 240–5.
- Tripathi, S., Chakraborty, A., Chakrabarti, A. y Bandyopadhyay, B. (2007). Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2840-2848.
- Trouvelot, A., Kough, J.L, Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. Gianinazzi-Pearson V and Gianinazzi S eds., INRA, Paris, 101-109.
- Vernetti Jr, F; Da Silva, A y Braga, L. (2009). Sustentabilidade de sistemas de rotação e sucessão de culturas em solos de várzea no Sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria 39(6), 1708-1714.
- Vinhal-Freitas, I. C., Ferreira, A. S., Corrêa, G. F. y Wendling, B. (2013). Land use impact on microbial and biochemical indicators in agroecosystems of the Brazilian Cerrado. *Vadose Zone Journal*, 12(1), 1-8.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J. y Melillo, J. M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, 277, 494-499.
- Wang, O., Zhou, D., Cang, L., Li, L. y Zhu, H. (2007). Indication of soil heavy metal pollution with earthworms and soil microbial biomass carbon in the vicinity of an abandoned copper mine in Eastern Nanjing, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67 (1), 75-81.
- White, D.C. y Macnaughton, S.J. (1997). Chemical and molecular approaches for rapid assessment of the biological status of soil. En: *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, New York: 371- 396.
- Yu Y., Xue L. y Yang L. (2013). Winter legumes in rice crop rotations reduces nitrogen loss, and improves rice yield and soil nitrogen supply. *INRA and Springer-Verlag France*, 34, 633–640.
- Zagal, E., Muñoz, C., Quiroz, M. y Córdova, C. (2009). Sensitivity of early indicators for evaluating quality changes in soil organic matter. *Elsevier. Genoderma*, 151,191-198
- Zahir, Z. A., Asghar, H. N. y Arshad M. (2001). Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 405-408.
- Zorrilla, G., Martínez, C., Berrío, L., Corredor, E., Carmona, L. y E. Pulver. (2013). Improving rice production systems in Latin America and the Caribbean. En: *Eco-efficiency: from vision to reality*. Ediciones de International Center of Tropical Agriculture. Cali, Colombia. 161–170.