

Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

**“Evaluación microbiológica de productos
agronómicos comerciales orgánicos
(Microgeo®) en suelos de Uruguay”**

Carla Silva Marrero



Orientadora: Dra. Adriana Montañez
Laboratorio de Microbiología de Suelos, IECA, Facultad de Ciencias

Marzo MMXXIV

Resumen

En este trabajo, se evaluó el efecto de la aplicación de un Biofertilizante derivado de Estiércol Tratado Aeróbicamente (BETA) sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. El objetivo fue determinar los cambios inducidos por el manejo del suelo con la aplicación de BETA y evaluar así, potenciales indicadores microbiológicos para detectar cambios en el mediano plazo. El área de estudio fue en Colonia, Uruguay (lat. 34,338164 S, long. 57,222630 W). Los materiales y métodos consistieron en el análisis de propiedades fisicoquímicas del suelo y 16 variables microbiológicas que fueron: carbono de biomasa microbiana, bacterias aeróbicas mesófilas, actinobacterias, hongos filamentosos, hidrolasas, deshidrogenasa, fosfatasa ácida y alcalina, degradadores de celulosa, bacterias solubilizadoras de fósforo, microorganismos nitrificantes, desnitrificantes y fijadores de nitrógeno de vida libre (diazótrofos), glomalina, índice de patogenicidad del suelo y el potencial de mineralización de nitrógeno. Todas ellas fueron evaluadas en un sitio con tres años de aplicación de BETA. Entre los resultados principales resalta que la aplicación de BETA aumentó el CBM del suelo (aunque no de forma significativa), las enzimas del suelo ($p < 0,05$) y algunos grupos funcionales ($p < 0,05$). El IP disminuyó con la aplicación de BETA de forma significativa ($p < 0,05$) y el PMN, fue significativamente alto ($p < 0,05$) en el suelo tratado con BETA. No se detectaron variaciones significativas para las variables químicas. En este trabajo las variables biológicas CBM, actividad enzimática de AcPh, NMP de diazótrofos, microorganismos celulolíticos, IP y PMN surgieron como indicadores razonables para evaluar y monitorear los efectos de la aplicación del BETA.

Palabras clave adicionales: fertilización orgánica; indicadores microbiológicos. Abreviaturas utilizadas: AcPh (fosfatasa ácida); AIPh (fosfatasa alcalina); BETA (Biofertilizante derivado del Estiércol Tratado Aeróbicamente); s/BETA (Sin Biofertilizante derivado del Estiércol Tratado Aeróbicamente); DHasa (deshidrogenasa); PSRG (proteína del suelo relacionada con glomalina); Act. (Actinobacterias); BAM (bacterias aeróbicas mesófilas); CBM (carbono de biomasa microbiana); HF (hongos filamentosos); PMN (potencial de mineralización de nitrógeno); NMP (número más probable); PCA (análisis de componentes principales); COS (carbono orgánico del suelo); IP (índice de patogenicidad del suelo).

"En la agricultura orgánica, no existe la receta o el insumo milagroso que todos esperan y que todo lo resuelve al instante, lo que existe son muchas dudas y preguntas por hacernos en un largo camino por experimentar, en el que redescubramos con la sabiduría campesina, antiguos, pero nuevos criterios de sostenibilidad y autodeterminación para el campo"

Jairo Restrepo - ABC de la agricultura orgánica

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Uso de Biofertilizantes para una agricultura sostenible.....	5
1.2. Efectos de la aplicación de fertilizantes orgánicos elaborados a partir de estiércol	8
1.3. Importancia del uso de fertilizante orgánico derivado de estiércol tratado aeróbicamente en Uruguay	10
1.4. Indicadores biológicos para evaluar la salud del suelo	12
1.5. Microorganismos edáficos como Indicadores biológicos de calidad/salud del suelo.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Preguntas de investigación	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Diseño experimental y sitio de muestreo	16
3.2. Biofertilizante	17
3.3. Muestreo de suelo	18
3.4. Análisis fisicoquímicos del suelo	18
3.5. Propiedades microbiológicas y bioquímicas	18
3.5.1. Biomasa microbiana del suelo.....	19
3.5.2. Biodiversidad del suelo.....	19
3.5.3. Grupos funcionales microbianos	20
3.5.4. Actividad enzimática del suelo	21
3.5.5. Glomalina.....	21
3.5.6. CLPP (Perfil Fisiológico de Comunidades Microbianas).....	22
3.5.7. Capacidad supresora del suelo	22
3.5.8. Potencial de mineralización de nitrógeno.....	23
3.6. Análisis estadísticos	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35
7. ANEXO	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de Biofertilizantes para una agricultura sostenible

La intensificación de la agricultura moderna, que dio sus comienzos entre 1960 y 1980, permitió un incremento de la productividad agrícola, basado en el uso indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas químicos sintéticos (agroquímicos), lo que repercutió negativamente en los ecosistemas, deteriorando la salud del suelo y los cuerpos de agua, así como también la salud humana y la economía de los pequeños productores. Esto condujo en muchos casos a una grave degradación de los ecosistemas y la interrupción de los servicios ecosistémicos en todo el mundo durante las últimas décadas.

La erosión del suelo ha sido identificada como uno de los mayores desafíos para la salud del suelo y el desarrollo sostenible. La erosión afecta aproximadamente el 84% de las superficies terrestres del mundo y es una de las causas de degradación de suelos, que se estimaba en más de 33% en 2015 (FAO, 2015a).

Para lograr una agricultura sostenible, es necesario reducir la necesidad de aplicar insumos de origen mineral para fertilización. La sustitución total o parcial de fertilizantes minerales por enmiendas orgánicas es una buena práctica para solucionar los problemas del uso excesivo de fertilizantes minerales, mejorando las propiedades fisicoquímicas del suelo, las reservas de carbono y la biodiversidad del suelo. Las Directrices voluntarias de la FAO (Food and Agriculture Organization) sobre la gestión sostenible del suelo (VGSSM, del inglés) fomentan la adopción de prácticas agrícolas que construyen y retienen la materia orgánica del suelo (MOS) (FAO, 2016).

Es así que también en Uruguay, con el objetivo de contrarrestar los efectos negativos del uso intensivo del suelo, existen reglamentaciones del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MGAP), que exigen a los productores agropecuarios la presentación de un plan de uso y manejo responsable del suelo, que tenga en cuenta las prácticas de manejo, la secuencia de cultivos, y la erosión tolerable (Decreto Ley N° 15239, 1982). Sin embargo, estas medidas sólo apuntan a disminuir la erosión física, mientras que la contaminación química y la degradación biológica de los suelos aún requiere de una mayor atención.

Los fertilizantes orgánicos, así como las enmiendas orgánicas, como estiércol, paja o mezcla de estiércol y el compost, se han propuesto como alternativas a la

fertilización mineral. Este tipo de prácticas agrícolas son importantes para la conservación de las funciones del suelo, las cuales están reguladas por un conjunto de interacciones complejas entre los atributos físicos, químicos y biológicos (FAO, 2016; Francioli *et al.*, 2016).

En Uruguay, desde el 15 de agosto de 2018, mediante la Resolución N° 97/018 (2018), de la DGSA-MGAP (Dirección General de Servicios Agrícolas-MGAP) se establecen los requisitos para el registro y control para la comercialización de insumos formulados a partir de materia prima de origen orgánico para uso agrícola. Estos incluyen las enmiendas orgánicas, fertilizantes orgánicos, fertilizantes órgano-mineral y otros insumos de origen orgánico especiales.

A nivel de la literatura existen varios términos utilizados con respecto a insumos de origen biológico, como sustitutos a la fertilización mineral y muchas veces se utilizan en forma indistinta, no existiendo consenso sobre su definición. A los efectos de utilizar una única terminología, se resumen a modo de glosario varios de los términos que serán utilizados en la redacción de este trabajo (Tabla 1

Tabla 1.
Glosario de términos usado en este trabajo.

Termino	Definición	Referencia
Biopreparados	Incluyen a todos los recursos biológicos que, a través de la intervención humana, estimulan el desarrollo de los cultivos agrícolas mediante transformaciones por parte de los microorganismos, de elementos o compuestos que se encuentran en formas no aprovechables, a formas que puedan ser utilizadas por la planta.	Martínez, 2002
Biofertilizantes O Bioestimulantes	Un Biofertilizante es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo creando un entorno microbiológico natural.	FAO, 2009
Compost	Insumo resultante de la descomposición aeróbica de materias primas orgánicas, que alcanza temperaturas que permiten la higienización. Este producto está constituido principalmente por materia orgánica estabilizada y microorganismos benéficos, donde no se reconoce su origen. Es libre de patógenos y semillas	Resolución N° 97/018, 2018.

	viabiles de plantas y se puede aplicar al suelo mejorando sus características físicas, químicas y biológicas.	
Enmienda orgánica	Insumo procedente de materiales carbonados de origen vegetal y/o animal, utilizado fundamentalmente para mantener o aumentar el contenido de MOS, mejorar sus propiedades físicas, actividad química o biológica vegetal.	Resolución N° 97/018, 2018
Fertilizante orgánico	Insumo cuya función principal es aportar nutrientes a las plantas, los cuales proceden de materiales carbonados de origen animal y/o vegetal.	Resolución N° 97/018, 2018
Estiércol	Material orgánico empleado para fertilizar la tierra, compuesto generalmente por heces y orina de animales domésticos. Puede presentarse mezclado con material vegetal como paja, heno o material de cama de los animales. Aunque el estiércol es rico en nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), comparado con los fertilizantes sintéticos sus contenidos son menores y se encuentran en forma orgánica. Puede aplicarse en mayor cantidad para alcanzar las cantidades que necesita el cultivo, pero en general, el N es menos estable y está disponible por menos tiempo en el suelo. Es rico en materia orgánica, por lo que aumenta la fertilidad del suelo y mejora su capacidad de absorción y retención de agua	FAO, 2013
Bocashi	El Bocashi, es un biopreparado sólido hecho a base de desechos vegetales (por ej. Cáscara y salvado de arroz y carbón molido), estiércol de vaca o de otros animales, melaza, levadura, tierra y agua. Se puede agregar polvo de rocas, carbonato de calcio, ceniza de fogón, entre otros ingredientes locales. En condiciones favorables se produce un material parcialmente estable, de lenta descomposición, mediante el cual se incorporan al suelo materia orgánica y nutrientes esenciales.	Shintani, 2000
Supermagro	El supermagro es un tipo de biofertilizante líquido completo rico en macro y micronutrientes y otros metabolitos. Es elaborado mediante un proceso de descomposición de la materia orgánica, a través de fermentación en medio líquido. Este biofertilizante se elabora a partir de estiércol, sales minerales, leche,	Restrepo, 2007

	melaza y otros aditivos naturales. Contiene: N, P, K, S,, Ca,, Mg, Mn, Zn, Mo, Cu, B y Fe.	
--	--	--

Nota: Definiciones de términos usados en el texto de la tesina, basadas en el MGAP, la FAO y referencias de acuerdo a la base de datos de Timbó.

1.2. Efectos de la aplicación de fertilizantes orgánicos elaborados a partir de estiércol

Los fertilizantes orgánicos, a pesar de contener cantidades menores de nutrientes en comparación con los fertilizantes minerales sintéticos, mantienen una disponibilidad constante de los elementos durante el desarrollo del cultivo, repercutiendo en una nutrición equilibrada. También colaboran en la formación de agregados del suelo. Además, pueden contener sustancias húmicas y fúlvicas, las cuales mejoran la estructura del suelo, y modifican propiedades como el pH, la capacidad de intercambio iónico, la disponibilidad de nutrientes e incrementan la población microbiana, propiciando el desarrollo del cultivo (Wei *et al.*, 2022).

Las aplicaciones de estiércol tratado, incorporan beneficiosamente los nutrientes excretados en el ciclo de nutrientes agrícolas. Estos nutrientes, junto al contenido microbiano y orgánico de los abonos, pueden promover la salud del suelo, aunque debido a las variaciones en la dieta de los animales, el manejo del estiércol y el procedimiento de almacenamiento, los nutrientes y las concentraciones varían (Marinari *et al.*, 2000).

Los fertilizantes inorgánicos pueden tener efectos negativos tanto directos debido a los efectos osmóticos inducidos por el fertilizante como indirectos, a través de cambios en el pH del suelo (Zhang *et al.*, 2018, Wei, *et al.*, 2022).

Por el contrario, los fertilizantes orgánicos (incluido el estiércol) suelen tener efectos positivos sobre las comunidades microbianas del suelo (Chinnadurai, *et al.*, 2014; Hartmann *et al.*, 2015; Francioli *et al.*, 2016).

La aplicación de estiércol y compost en tierras agrícolas ha demostrado un aumento positivo en la retención de agua y nutrientes, activa el ciclado de nutrientes, la transformación de carbono, la biodiversidad, la estructura y la agregación del suelo, al tiempo que mejora el contenido de materia orgánica

(Treonis *et al.*, 2010; Nair y Ngouajio, 2012; Liu *et al.*, 2020) y la supresión de patógenos transmitidos por el suelo (Zaccardelli *et al.*, 2013, Vida *et al.*, 2019). De esta forma, en una perspectiva a largo plazo, el estiércol podría potencialmente sustituir parte de los fertilizantes minerales.

El suministro de estiércol a los suelos agrícolas es una práctica antigua y una estrategia bien probada para aumentar la MOS, reponer los nutrientes básicos de las plantas, mejorar la respuesta del rendimiento a los fertilizantes y restaurar la productividad del suelo en áreas degradadas (Schröder, 2005; Rufino *et al.*, 2007; Bogaard *et al.*, 2013; Nezomba *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, las aplicaciones excesivas de estiércol y las prácticas ineficientes de aplicación de estiércol pueden tener efectos perjudiciales en el medio ambiente a múltiples escalas, como la contaminación de los recursos hídricos y del suelo a nivel local y regional, y el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) a nivel local y mundial (Sutton, 2011; Tubiello *et al.*, 2013).

El estiércol es rico en N, P y carbono (Pagliari y Laboski 2012) y puede contribuir a incrementar el cambio climático global a través de la emisión de metano y óxido nitroso (Leytem *et al.*, 2011). Por lo tanto, si bien el reciclaje del estiércol de ganado dentro de los sistemas agrícolas es necesario para mejorar y mantener la salud del suelo, su manejo eficiente también es importante para reducir el impacto ambiental de las actividades agrícolas. Por lo tanto, el tratamiento del estiércol se convierte en un tema central en relación con las políticas nacionales actuales en materia ambiental, climática y de energías renovables.

El compostaje del estiércol, es un tratamiento aconsejable, respecto a la aplicación de estiércol fresco en forma directa, por razones de seguridad alimentaria y ambiental, porque el tratamiento del estiércol, ya sea por procesos como compostaje, digestión, fermentación aeróbica y anaeróbica, mineralización, etc. reduce la viabilidad de patógenos, así como de semillas de malezas y facilita la liberación de nutrientes para las plantas y el suelo.

1.3. Importancia del uso de fertilizante orgánico derivado de estiércol tratado aeróbicamente en Uruguay

La agricultura uruguaya se ha intensificado durante los últimos 15 años, con un gran aporte de fertilizantes minerales y otros agroquímicos (Nair, 2014). Uruguay es un país ganadero por excelencia, donde gran parte de las regiones agropecuarias se destina a la producción ganadera (6.467.000 has, un 40% del total). (Anuario MGAP, 2022).

En Uruguay hay 11.411.000 cabezas de ganado, de las cuales 9.019.000 corresponden a ganado vacuno (Anuario MGAP, 2022) y cada animal en promedio defeca, según diversas fuentes, 25 - 45 kg de bosta por día (Marsh y Campling, 1970; Fincher *et al.*, 1981; Millot *et al.*, 1987). Esto conlleva a una acumulación importante de bosta en el suelo que genera emanaciones de gases de efecto invernadero.

Los datos sobre emisiones de GEI del estiércol depositado en las pasturas consisten en óxido nitroso (N_2O) generado por las adiciones de N a los suelos gestionados por parte del ganado en pastoreo y depende de la intensificación del mismo (Figura 1). Las emisiones de GEI del estiércol depositado en las pasturas consisten en emisiones directas e indirectas de N_2O procedentes del N del estiércol que los animales de pastoreo depositan en las pasturas. Más concretamente, se produce N_2O a través de los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación que tienen lugar en el punto de deposición (emisiones directas) y tras los procesos de volatilización/redeposición y lixiviación (emisiones indirectas) (FAO, 2015b).

Mientras que a nivel mundial los cultivos inundados son responsables el 12% de las emisiones de GEI, en Uruguay la agricultura representa el 90% de las emisiones nacionales, siendo un 2% debido al manejo del estiércol (Irisarri, 2009).

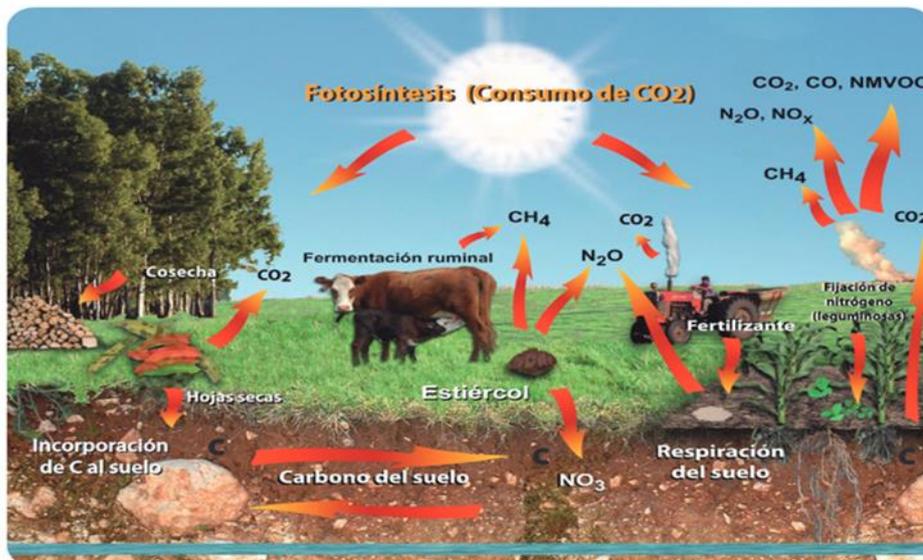


Figura 1.

Emisiones GEI en sistema ganadero. Diagrama que refleja la dinámica en las emisiones GEI de un sistema de producción ganadera en nuestro país. El énfasis de las emisiones dependerá de su grado de intensificación. (Tomado de INIA, 2022).

Elaborado por: G. Boné y G. Becoña

El uso del estiércol en la preparación de bioinsumos para la agricultura es una alternativa económica y ecológicamente sostenible. Además de su utilización, a efectos de mitigar estos efectos nocivos de emisiones de gases, el estiércol es una importante fuente de nutrientes para los cultivos en todo el mundo. Más del 20% de N aplicado a las tierras de cultivo en todo el mundo se encuentra en estiércol (FAO; 2018). En Uruguay, a pesar de ser un país ganadero, el uso de estiércol en la preparación de bioinsumos se utiliza principalmente en la agricultura orgánica y agroecología, siendo el bokashi (sólido) y supermagro (líquido) las preparaciones más conocidas (Tabla 1). Sin embargo, es de destacar que, en los últimos años, la aplicación de estiércol previamente tratado, ha llamado mucho la atención, y en la actualidad un grupo de agricultores uruguayos está incorporando una nueva tecnología desarrollada en la Universidad de São Paulo, Brasil (D'Andrea & Medeiros, 2002), basada en un proceso *in situ* que consiste en un tratamiento aeróbico, en tanques abiertos, del estiércol colectado en el predio. Actualmente existen más de 52 tanques instalados en el país, y el compostaje del estiércol líquido se aplica en aproximadamente, 8.000 há.

La evaluación de la salud del suelo después de la aplicación del fertilizante orgánico es esencial para evaluar los cambios en el suelo como resultado de las

prácticas de manejo. En el marco de la producción agrícola sostenible, una alta calidad y salud del suelo debe mantener una alta productividad sin una degradación significativa del suelo o del medio ambiente (Govaerts *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2010; Bünemann *et al.*, 2018). Para ello, se debe seleccionar un conjunto de indicadores biológicos de salud del suelo para asesorar a los agricultores sobre si esta estrategia de manejo produce los cambios positivos que anticiparon.

1.4. Indicadores biológicos para evaluar la salud del suelo

Según la FAO (2008) la definición de salud del suelo es:

“La capacidad del suelo para funcionar como un sistema vivo. Suelos sanos pueden mantener una comunidad diversa de organismos, que ayudan a controlar las enfermedades de las plantas, las plagas de insectos y malezas, formando asociaciones simbióticas beneficiosas con las raíces de las plantas, reciclar nutrientes esenciales de éstas, mejorar la estructura del suelo con efectos positivos para el agua de éste, y la capacidad de retención de nutrientes. En última instancia, también, mejorar la producción de cultivos. Un suelo saludable, también contribuye a mitigar el cambio climático al mantener o aumentar su contenido de carbono”

En 2015, la Carta Mundial del Suelo (FAO, 2015) declaró:

“Los suelos son una reserva clave de biodiversidad mundial que abarca desde los microorganismos a la flora y la fauna. Esta biodiversidad tiene una función fundamental en el respaldo a las funciones del suelo y, por tanto, a los bienes y servicios ecosistémicos asociados con los suelos. Por lo tanto, es necesario mantener la biodiversidad del suelo a fin de salvaguardar estas funciones.”

Se suele suponer que los indicadores biológicos del suelo son buenos indicadores de calidad del mismo debido a su sensibilidad y capacidad para reflejar los efectos del manejo del suelo (Kaschuk *et al.*, 2011; Bowles *et al.*, 2014; Benintende *et al.*, 2015). Los indicadores biológicos del suelo representan

la conexión entre la abundancia y actividad de la biodiversidad del suelo, el ciclo de nutrientes y la resiliencia del suelo (McGuire y Treseder, 2010).

Los indicadores biológicos de salud del suelo son útiles debido a que reflejan los cambios debido al manejo del suelo de forma temprana, antes que ocurran pérdidas irreversibles de suelo y biodiversidad (McGuire y Treseder, 2010; Bowles *et al.*, 2014; Benintende *et al.*, 2015). En general, la salud del suelo se ha relacionado con el contenido de MOS (Gao, 2006), fertilidad y estructura del suelo, N total y relación C/N (Murphy *et al.*, 2011), pero estas propiedades del suelo no necesariamente cambian como resultado de cambios en las condiciones externas o el uso (Chodak y Niklinska, 2010; Preem *et al.*, 2012; Muscolo *et al.*, 2014), y apenas reflejan cambios a corto plazo en los procesos del suelo asociados a nuevas amenazas ambientales. Por el contrario, los cambios en las características del suelo o las condiciones ambientales inducen cambios rápidos en la biomasa microbiana, la composición y la actividad de la comunidad (Schröder *et al.*, 2003; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010).

En algunos casos, los cambios en las comunidades microbianas y la actividad pueden preceder a los cambios detectables en las propiedades físicas y químicas del suelo, proporcionando así una señal temprana de mejora del suelo o una advertencia temprana de degradación del suelo (Muscolo *et al.*, 2014). Sin embargo, aún existe una falta de consenso sobre qué medir para la evaluación de la biota del suelo vinculada a la salud del suelo y la consiguiente predicción de la sostenibilidad o la productividad (Saha *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2014).

1.5. Microorganismos edáficos como Indicadores biológicos de calidad/salud del suelo

En el marco de la producción agrícola sostenible, la alta calidad del suelo y la salud deben mantener una alta productividad sin una degradación ambiental o del suelo significativa (Emmerling *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2010).

En general, las propiedades fisicoquímicas del suelo son de poca utilidad como indicadores de la calidad del suelo, ya que se modifican sólo cuando el suelo experimenta un cambio realmente drástico (Filip, 2002). La microbiota del suelo

también se ve afectada por los atributos del suelo y varía según las condiciones ambientales como la temperatura, la humedad, la calidad del material orgánico, la concentración de nutrientes como P y N, así como el pH, la textura del suelo y la compactación del suelo (Wilkinson *et al.*, 2002; Chodak y Niklinska, 2010; Preem *et al.*, 2012). Además, los microorganismos pueden responder rápidamente a las condiciones ambientales cambiantes modificando la biomasa microbiana, la composición y la actividad de la comunidad (Klein *et al.*, 1985; Nannipieri *et al.*, 1990; Yakovchenko *et al.*, 1996; Schloter *et al.*, 2003; Gil-Sotres *et al.*, 2005). Es necesario comprender mejor qué propiedades microbianas del suelo proporcionan información precisa sobre la salud y el manejo del mismo. La caracterización de múltiples parámetros microbiológicos del suelo para mejorar la comprensión de la correlación entre la biota del suelo y los efectos positivos o negativos sobre las funciones microbianas y los servicios ecosistémicos no ha sido tan ampliamente considerada.

Dado que los microorganismos participan en muchos procesos del suelo, también pueden proporcionar una medida integrada de la salud de este, un aspecto que no se puede obtener sólo con medidas físico-químicas. Además, la información disponible a veces es conflictiva con respecto a la influencia de diferentes prácticas agrícolas en la biomasa microbiana del suelo y la diversidad microbiana (Chu *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2008 y Dong *et al.*, 2014). La mayoría de los estudios relacionados con variables biológicas de los indicadores de calidad del suelo muestran resultados con respecto a grupos microbianos funcionales claves, del suelo, así como características microbianas específicas, como la actividad enzimática del suelo, el N o el Carbono de la biomasa microbiana (CBM) (Huang *et al.*, 2014), la respiración basal, el perfil de ácidos grasos metil-ésteres (del inglés, FAME), la extracción de ADN y la amplificación de genes funcionales (Dose *et al.*, 2015), o la concentración de glomalina. Todos estos parámetros tienen potencial de uso como indicadores de alerta temprana de la salud del suelo.

2. OBJETIVOS

En este estudio se evaluó el impacto de la aplicación de un Biofertilizante derivado de Estiércol Tratado Aeróbicamente (**BETA**) sobre las características

microbiológicas del suelo, para identificar y seleccionar un conjunto mínimo de indicadores microbiológicos, para monitorear cambios tempranos en la salud del suelo. El objetivo de este estudio fue determinar cuáles de esos parámetros microbianos de los suelos permiten una diferenciación factible y confiable entre la aplicación y la no aplicación de BETA y poder determinar indicadores microbiológicos efectivos para evaluar la salud del suelo.

2.1. Preguntas de investigación

¿La aplicación de BETA provoca cambios en la actividad microbiana del suelo, que reflejan una mejora en la salud del suelo, comprobada por diferencias significativas entre el sitio con aplicación y otro sin aplicación (control)?

¿Existen indicadores microbiológicos, en estas condiciones, que pueden tomarse en cuenta a la hora de medir la salud del suelo?

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental y sitio de muestreo

El área de estudio está ubicada en Colonia, Uruguay (latitud 34,338164 S, longitud 57,222630 W). El clima del área se clasifica como subtropical húmedo, con una temperatura promedio de 24° C y una precipitación media anual de 1200 mm. El suelo es un Brunosol Eutrico según la clasificación de suelos de Duran (1991).

Dentro del área de estudio, se seleccionó una zona de 3 años de aplicación continua de BETA (Tabla 2). La parcela tiene una medida de 12 x 12 metros. Se tomaron 4 muestras compuestas de 10 submuestras de 4 alturas de la pendiente, luego de tamizarlas, se mezclaron para evitar el efecto de la pendiente.

Tabla 2.

Rotaciones de cultivos.

Año/estación	Secuencia de cultivos / aplicación de BETA
2013	
Otoño	Cultivo de cobertura / BETA
Primavera	Sorgo / BETA
2014	
Otoño	Trigo / BETA
Primavera	Soja / BETA
2015	
Otoño	Cultivo de cobertura / BETA
Primavera	Maíz / BETA

Nota: Aplicación de BETA a razón de 300 L. ha⁻¹ en riego.

3.2. Biofertilizante

El Biofertilizante BETA utilizado en el experimento se obtuvo mediante el tratamiento aeróbico *in situ* del estiércol de ganado de acuerdo con el método desarrollado en la Universidad de Sao Paulo, Brasil (Patente #P10207342 A2-0). El Biofertilizante líquido se obtuvo mediante un régimen continuo de biodegradación aeróbica en tanques aireados llenos con 15% de estiércol de ganado de la granja, 80% de agua y 5% de micronutrientes y aditivos obtenidos comercialmente (Microgeo®). Este Biofertilizante, denominado previamente BETA, se produce en medios líquidos a través de la biodegradación aeróbica continua (D'Andrea, 2002) de estiércol de ganado.

El BETA se aplica después de la aparición de un cultivar (2-3 hojas) a una tasa de 300 L. ha⁻¹ por año, según la información proporcionada por la empresa que distribuye y representa el producto en Uruguay (Agrofuturo S.A.). El proceso de producción del BETA, es llevado a cabo por el propio agricultor, en su predio en tanques abiertos a la atmósfera, como se diagrama en la Figura 2.

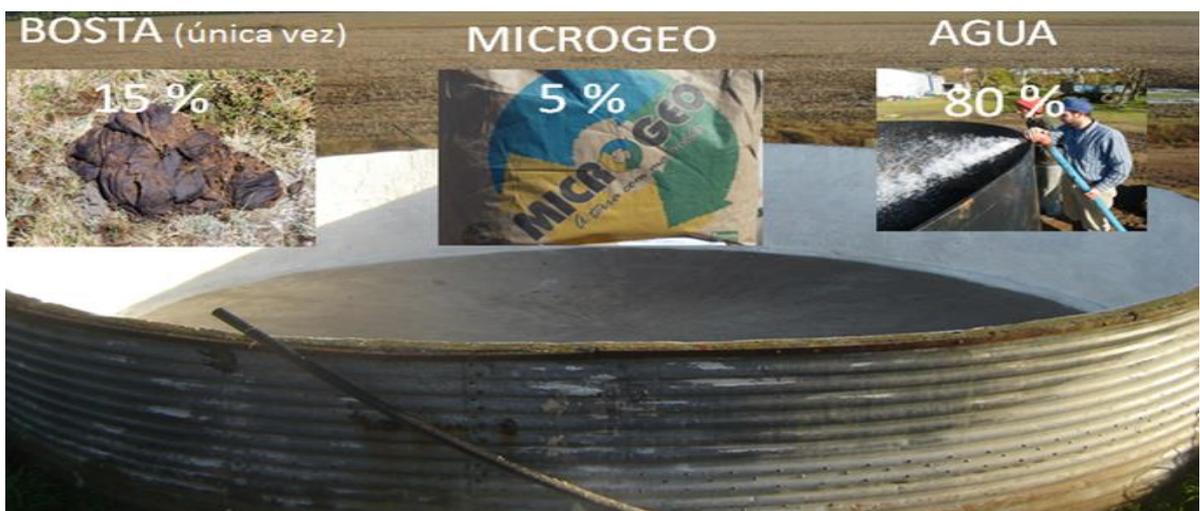


Figura 2.

Biofábrica de producción de Biofertilizante BETA.

Nota: Se agrega al inicio, en función del volumen del tanque: 15% de estiércol bovino y 5% de Microgeo. Se complementa con agua y se usa luego de 15 días del inóculo. Se debe instalar en lugar que reciba luz solar directa y se repone 2,5% de Microgeo del volumen usado. Se agita cada 3 días. Su aplicación es directa al suelo o foliar. (Manual técnico Microgeo. Disponible en: <https://docplayer.es/66374720-Manual-tecnico-fertilizacion-biologica.html>)

3.3. Muestreo de suelo

En la primavera de 2015 (septiembre) se tomaron cuatro muestras de suelo compuesto, de cada parcela de los tratamientos con y sin BETA. Cada muestra compuesta de suelo consistió en 10 submuestras de suelo (20 cm de profundidad, 10 cm de diámetro) de cada área de suelo uniforme.

Cada muestra se homogeneizó bien en bolsas plásticas estériles y se dividió en dos partes, para el análisis químico y microbiano. En este último, el suelo se tamizó a través de una malla de 2mm y se almacenó a 4 ° C y -20 ° C hasta que se analizó. Las muestras recogidas según la pendiente vertical, se mezclaron, formando un pool, a efectos de quitar el efecto de la pendiente en las repeticiones.

3.4. Análisis fisicoquímicos del suelo

Se determinó el pH activo de 1:25 (p / v) suspensión de suelo / agua, el carbono orgánico total del suelo (SOC) (Walkley-Black, 1934) y PO_4^{3-} del suelo (Bray 1, 1945). El N mineral de suelo (μNH_4^+), NO_3^- se midió colorimétricamente en extractos de KCl 1 M utilizando una relación de suelo y solución de 40 g / 200 mL. El contenido de agua en el suelo se midió y expresó como porcentaje de humedad (% H) y se determinó después de secar el suelo a 105° C durante 24 h. Las determinaciones químicas se realizaron en: laai, Laboratorio Analítico Agro Industrial

3.5. Propiedades microbiológicas y bioquímicas

Todos los parámetros microbianos se expresaron por peso de suelo seco. Se pesaron 10 g de suelo de los 4 pools de muestras del tratamiento (c/BETA) y control (s/BETA) apenas llegaron al laboratorio. Luego se colocaron en bandejas a 40° C en estufa hasta obtener pesos constantes.

Las diferentes actividades microbianas se agruparon de acuerdo con las siguientes propiedades del suelo: biomasa microbiana, biodiversidad, grupos funcionales relacionados a la fertilidad, actividad enzimática, glomalina, perfil de comunidades microbianas (CLPP, Community Level Physiological Profile), y capacidad supresora del suelo.

3.5.1. Biomasa microbiana del suelo

El parámetro seleccionado, para estimar la biomasa microbiana, fue la biomasa total de carbono microbiano (CBM). Es el componente biótico de la materia orgánica del suelo, sin tomar en cuenta raíces de plantas y fauna (Jenkinson y Ladd, 1981). El CBM actúa como agente de transformación de la materia orgánica en el suelo y ha sido reportada por muchos autores como un indicador sensible de la calidad del suelo (Benintende *et al.*, 2015, Bowles *et al.*, 2014.)

La técnica usada para determinar el CBM fue el método de extracción por fumigación con cloroformo (Vance *et al.*, 1987), y los cálculos para calcular a partir del carbono soluble, el CBM, se llevaron a cabo con un coeficiente de eficiencia de extracción de 0,35 (Sparling *et al.*, 1990).

Se pesan 25 g de suelo fresco, se fumiga por 24 h. Luego se agrega K_2SO_4 0.5 M en proporción 1:5, se agita a 25° C por 30 minutos. Posteriormente se filtra, se ajusta pH a 6.5 – 6.8 y se digieren 4 mL de filtrado con 5 mL de $K_2Cr_2O_6$ 0.05 M más 5 mL de H_2SO_4 cc. Calentar a 150° por 30 minutos y medir absorbancia a 600 nm.

3.5.2. Biodiversidad del suelo

La enumeración de las bacterias aerobias mesófilas totales (BMA), los hongos filamentosos (HF) y los actinomicetos (Act.) se evaluaron mediante técnica de conteo en placas.

Se realizaron diluciones seriadas (al décimo) de los suelos y 100 μ L de cada dilución (Anexo 8.1) Se sembraron con *Asa rastrillo* Digrafsky en la superficie de las placas con medios apropiados para cada grupo microbiano (Anexo 8.2). Cada dilución se sembró por triplicado.

Las BMA se enumeraron en medio rico Ty (Beringer 1974) con 1 mL de anfotericina B (1,5 mg.ml⁻¹), el recuento de HF (Frioni, 2011) se realizó en agar Rosa Bengala con 1 mL de estreptomycin (3 mg.ml⁻¹) y los Act (Frioni, 2011) se observaron en agar de aislamiento de actinomicetos. (Frioni, 2011).

Las placas se incubaron a 28 ° C y los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo seco. El recuento de BMA se realizó a las 48 h y el de HF y Act. después de 72 h de incubación.

3.5.3. Grupos funcionales microbianos

Se analizaron las comunidades de grupos funcionales microbianos implicados en los ciclos del C (celulolíticos), del P (microorganismos solubilizadores de P) y del N (fijadores de N₂ en vida libre, nitrificantes y desnitrificantes de amonio).

La cuantificación de celulolíticos (Frioni, 2011) se determinó utilizando la técnica de número más probable (NMP). Los tubos con medio mínimo libre de cualquier fuente de C ([Anexo 8.3](#)) a los que se le agregó un trozo de papel de Whatman 1 de 50 mg estéril, se inocularon con diluciones de suelo (100 µL por tubo por triplicado) y se incubaron a 28°C y 140 rpm durante 20 días. Se consideraron positivos los tubos con la tira de papel degradada por microorganismos, sin considerar el deterioro normal por el efecto del líquido.

Para los microorganismos solubilizadores de P, se plaquearon, por triplicado, las diluciones de suelo (100 µL) en placas que contenían medio de crecimiento NBRIP ([Anexo 8.4](#)) que tiene fosfato inorgánico como fuente de P (Nautiyal 1999). Las placas se incubaron a 28° C por 5 días. Se consideró positiva la actividad de solubilización de P cuando se presentó un halo de hidrólisis alrededor de las colonias, en el medio de cultivo respectivo. Los resultados se expresaron como ufc de microorganismos solubilizadores de P por gramo de suelo seco.

Se utilizó la técnica de NMP para cuantificar los microorganismos oxidantes de amonio, desnitrificantes y fijadores de nitrógeno de vida libre ([Anexo 8.5](#)). En el caso de oxidantes de amonio (Schinner *et al.*, 1996), se inocularon con diluciones de suelo (500 µL por tubo) por triplicado, en 4 mL de medio de nitratantes de Schinner *et al.* (1996) y se incubaron a 28° C por 24 días. Se consideraron positivos los tubos que presentaron color azul, luego de revelarlos con reactivo de difenilamina sulfúrica y ácido sulfúrico ([Anexo 8.5](#)). Para evaluar los microorganismos desnitrificantes (Schinner *et al.*, 1996), se inocularon 100 µL de diluciones de suelo por triplicado en tubos con 9 mL de medio de desnitrificantes, con campana de Durham. Se incubaron 15 días a 28°C en reposo. Se consideraron tubos positivos los que tenían una burbuja de gas encerrada bajo la campana. Para microorganismos diazótrofos, se inocularon 100 µL de diluciones de suelo, en medios semisólidos LGI, jNFB y JMV (Baldani *et al.*, 2014) por triplicado. Se incubaron 10 días a 28 °C y se revelaron. Se

consideraron tubos positivos los que realizaron viraje de color según el microorganismo considerado para cada medio (Baldani *et al.*, 2014).

3.5.4. Actividad enzimática del suelo

Las actividades enzimáticas de Hidrolasas (hidrólisis del diacetato de fluoresceína, FDA), deshidrogenasa (DHAsa), y fosfatasa alcalina y ácida (AlPh, AcPh) se analizaron en función de la determinación colorimétrica del producto liberado por la enzima, utilizando un espectrofotómetro. Las actividades enzimáticas se expresaron como microgramos de producto producido por gramo de suelo seco.

La reacción de hidrólisis de la FDA se determinó de acuerdo con los métodos de Adam y Duncan (2001), y la actividad de DHAsa se realizó de acuerdo con el procedimiento de Casida *et al.*, (1964). Las enzimas AlPh y AcPh se determinaron por la metodología descrita por Eivazi y Tabatabai (1977), con fosfato de *p*-nitrofenilo.

3.5.5. Glomalina

La extracción PSRG se realizó mediante la adición de 8 ml de solución a 1 g de suelo, de citrato trisódico anhidro 50 mM a pH 8 en un tubo de centrifuga y luego se autoclavó a 121 °C durante 60 min. Después de cada extracción, la muestra se centrifugó a 3220 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante que contenía glomalina se recogió y almacenó a 4 ° C. Se llevaron a cabo al menos cuatro extracciones secuenciales hasta que el sobrenadante mostró un color amarillo pálido que indica la ausencia de glomalina. Entonces se cuantificó PSRG mediante el ensayo de unión a colorante de Bradford (Wright y Upadhyaya, 1998).

3.5.6. CLPP (Perfil Fisiológico de Comunidades Microbianas)

Para calcular el CLPP se siembra la dilución -3 de cada muestra de suelo, en pocillos con diferentes fuentes de carbono y se incuba durante algunos días para evaluar la actividad microbiana en respuesta a cada sustrato. Este procedimiento permite detectar patrones diferenciales de utilización de distintas fuentes carbonadas y realizar comparaciones de las comunidades de microorganismos del suelo y otros ambientes ante diversas situaciones.

Se usaron 12 fuentes de carbono: Celobiosa, L-histidina, hexano, rafinosa, triptófano, ácido itacónico, ácido galacturónico, asparagina, sorbitol, ácido málico, manitol y sacarosa. Para la realización de este ensayo se utilizaron placas de Elisa de 96 pocillos que contenían 50 μL de las diferentes fuentes de carbono (3 mg/mL), 50 μL de medio mínimo (Anexo 8.6) y 50 μL de diluciones de suelo. Se utilizó una sal de tetrazolio (iodonitrotetrazolium chloride) 0,0075%, como indicador redox que vira a violeta por la oxidación del sustrato. Cuanta más intensidad de color más sustrato se consumió (Yang *et al.*, 2013).

3.5.7. Capacidad supresora del suelo

El índice de patogenicidad (IP) del suelo es un indicador de la capacidad supresiva de patógenos del suelo. Para calcularlo, se sembraron diez semillas de soja esterilizadas superficialmente (1 minuto de alcohol 95%, lavado con agua estéril, posteriormente 4 minutos de hipoclorito de sodio 4% y 10 lavados con agua estéril) en la superficie de un montículo de 40 g de suelo colocado en papel absorbente y se agregó, 10 ml de agua estéril. La mezcla de suelo y semillas se envolvió en el papel absorbente y cada paquete se colocó en una bolsa de plástico estéril. Se evaluó el IP en suelo estéril y el mismo suelo no estéril por triplicado. Luego de la incubación del paquete, se contó el número de semillas que germinaron y emergieron después de 10 días a 22 °C en la oscuridad.

El IP se calculó de la siguiente manera:

$$\text{IP} = (\text{N}^\circ \text{ de semillas que emergieron en suelo estéril} - \text{N}^\circ \text{ de semilla que emergieron en suelo no estéril}) / \text{N}^\circ \text{ de semilla que emergieron en suelo estéril}$$

Los valores de IP varían de 0 a 1 siendo 0 indicador de una nula patogenicidad del suelo (Altier y Zerbino, 2014).

3.5.8. Potencial de mineralización de nitrógeno

El Potencial de mineralización de nitrógeno (PMN) se determinó incubando muestras de suelo (20 g) durante 7 días en condiciones aeróbicas a 25 ° C (Waring y Bremner, 1964).

3.6. Análisis estadísticos

Los sitios fueron tratados como experimentos independientes y la comparación estadística principal fue entre la aplicación de Biofertilizante (con BETA) y la ausencia de aplicación (sin BETA). Se probó la normalidad de todos los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Los datos de los degradadores de celulosa, FDA, fijación de N y oxidantes de NH_4^+ se transformaron logarítmicamente para cumplir con el supuesto de normalidad de las pruebas estadísticas.

El efecto de la aplicación de BETA sobre las propiedades microbiológicas y químicas del suelo se analizó mediante un análisis factorial de varianza (ANOVA). Se utilizó el Tukey para identificar diferencias significativas ($p < 0,05$ o $p < 0,1$). La relación entre variables se determinó mediante análisis de correlación múltiple. El análisis de correlación entre los parámetros microbiológicos se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) para analizar la ordenación de los tratamientos según las propiedades biológicas del suelo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 17 variables microbianas diferentes relacionadas con varias funciones biológicas del suelo (Tabla 3). Los resultados de las CLPP indicaron que el seguimiento en el tiempo de las medidas de absorbancia, para la obtención de la curva hasta una meseta, resultó insuficiente para obtener datos robustos y por lo tanto se decidió no incluirlo en los análisis posteriores. También se analizaron, 5 parámetros fisicoquímicos (Tabla 4). El trabajo mostró variaciones con diferencias significativas, en varias de las propiedades microbiológicas evaluadas del suelo tratado y no tratado con BETA. (Tabla 3).

El análisis estadístico de las principales propiedades fisicoquímicas del suelo no mostró cambios con la aplicación de BETA (Tabla 4).

La aplicación de BETA tuvo efectos significativos positivos y negativos sobre los microorganismos aerobios mesófilos cultivables.

La aplicación de BETA provocó un aumento en los valores de microorganismos celulolíticos y diazótrofos y fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). y un incremento no significativo en solubilizadores de fósforo inorgánico y desnitrificantes. (Tabla 3).

Tabla 3.

Valores medios (n=4) de las variables microbiológicas seleccionadas medidas en parcelas biofertilizadas y no biofertilizadas con BETA (c/BETA y S/BETA respect.)

Parámetros biológicos	s/BETA (SD)	c/BETA (SD)
CBM ($\mu\text{g C } 100\text{-g}^{-1}$)	244.26 (280.93)	273.27 (242.96)
Microorganismos mesófilos Aeróbios (ufc g⁻¹ suelo seco)		
BMA	$4.7 \cdot 10^6$ (0.58)	$4.4 \cdot 10^6$ (0.96)
Act.	$2.3 \cdot 10^5$ (1.00)	$2.4 \cdot 10^5$ (0.22)
HF	$24.38 \cdot 10^4$ (12.20)	$9.6 \cdot 10^4$ (1.00)
Grupos funcionales		
Celulolíticos (NMP g ⁻¹ suelo seco)	$6.7 \cdot 10^3$ ** (15.82)	$18.6 \cdot 10^4$ ** (99.39)
Solubilizadores de fósforo (ufc g ⁻¹ suelo seco)	$10.6 \cdot 10^4$ (5.76)	$12.7 \cdot 10^4$ (15.73)
Diazótrofos (NMP g ⁻¹ suelo seco)	$7.14 \cdot 10^3$ ** (6.44)	$19.16 \cdot 10^3$ ** (4.89)
Ox. de NH ₄ ⁺ (NMP g ⁻¹ suelo seco)	$5.28 \cdot 10^1$ (3.02)	$2.14 \cdot 10^1$ (2.21)
Microorganismos desnitrificadores (NMP g ⁻¹ suelo seco)	0.36 (0.26)	3.16 (4,24)
Actividad enzimática del Suelo		
Hidrolasas ($\mu\text{g FDA g}^{-1} \cdot 0,5\text{-h}^{-1}$)	9.18 (0.75)	9.52 (0.84)
DHasa ($\mu\text{g INTF g}^{-1} 2\text{-h}^{-1}$)	41.64 (30.91)	53.40 (34.18)
AIPh ($\mu\text{g pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	5.63 (3.68)	6.21 (4.55)
AcPh ($\mu\text{g pNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	29.16 ** (2.31)	38.23 ** (4.16)
IP	0.76 ** (0.07)	0.63 ** (0.04)
PSRG ($\mu\text{g BSA g}^{-1}$ suelo seco)	69.8 (4.30)	69.07 (2.45)
PMN ($\mu\text{g N g}^{-1}$)	25* (0.8)	33* (5.19)

Nota: Valores medios (n=4) y desviación estándar (Anexo 8.7) de los parámetros microbiológicos del suelo, para cada sitio biofertilizado con BETA (c/BETA) y sin aplicación de Biofertilizante (s/BETA). CBM: carbono de biomasa microbiana. PMN: Potencial de mineralización de Nitrógeno. BMA: bacterias aeróbicas mesófilas. Act.: actinobacterias. HF: hongos filamentosos. NMP: número más probable; FDA: hidrólisis de diacetato de fluoresceína. DHasa: deshidrogenasa. INTF: yodonitrotetrazolio formazán; AIPh: fosfatasa alcalina. AcPh: fosfatasa ácida. pNP: fosfato de p-nitrofenilo; IP: índice de patogenicidad del suelo. PSRG: proteína del suelo relacionada con la glomalina; BSA: albúmina de suero bovino. Los asteriscos indican diferencias significativas entre parcelas biofertilizadas y no biofertilizadas (** p< 0,05 y * p<0,1).

Tabla 4

Valores medios ($n=4$) de los parámetros fisicoquímicos del suelo para cada sitio biofertilizado con BETA y sin biofertilizar.

Parámetros fisicoquímicos	Suelo no tratado (s/BETA) (SD)	Suelo tratado (c/BETA) (SD)
pH	5.5 (0.15)	5.4 (0.01)
Humedad (%)	19.0 (1.88)	18.8 (1.42)
COS (%)	5.3 (0.37)	4.5 (0.21)
N-NO ₃ (μg N g ⁻¹)	10.6 (3,54)	12.2 (3,15)
P (μg P g ⁻¹)	45 (4.20)	54 (5.77)
K (mg 100 g ⁻¹)	0.6 (0.21)	0.9 (0.08)

Nota: Valores medios ($n=4$) y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos del suelo para cada sitio biofertilizado con beta(c/BETA) y no biofertilizado (s/BETA). COS: Carbono orgánico total del suelo; N-NO₃: Nitrógeno inorgánico; P: Fósforo disponible como PO₄³⁻, K: Potasio intercambiable. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos c/BETA y s/ BETA según la prueba LSD (** $p<0,05$).

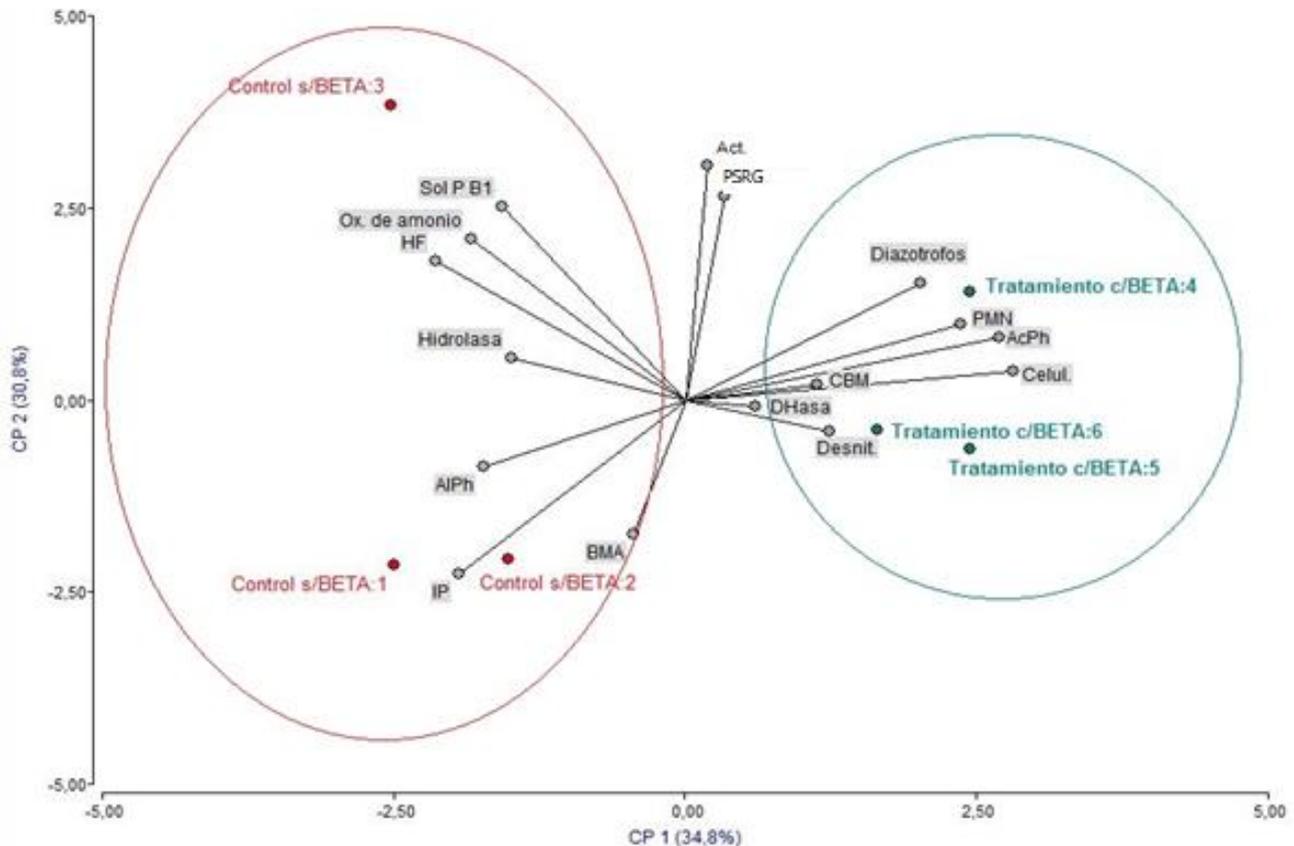


Figura 3:

Biplot de la ordenación de componentes principales (PCA)

Nota: PCA incluyendo 16 de las propiedades biológicas del suelo (autovectores generados en [Anexo 8.6](#)). c/BETA: aplicación de Biofertilizante en base a estiércol tratado aeróbicamente en primavera de 2015. s/BETA: control sin aplicación de Biofertilizante en primavera de 2015. AIPh: fosfatasa alcalina. AcPh: fosfatasa ácida. Celul.: degradadores de celulosa. CBM: Carbono de la biomasa microbiana. Desnit.: microorganismos desnitrificantes. DHasa: deshidrogenasa. Act.: actinobacterias, BMA: bacterias aerobias mesófilas. HF: hongos filamentosos, B Sol P: Bacterias solubilizadoras de Fósforo, IP: índice de patogenicidad del suelo, PMN: Potencial de Mineralización del Nitrógeno.

En el Biplot de la [Figura 3](#), donde se grafica el cálculo de componentes principales podemos observar que hay una separación en cuanto a parcelas con tratamiento y parcelas control. Con respecto al componente principal 1 (CP1) y explica el 34.8 % de la variabilidad. Las variantes con más peso en esta ordenación fueron: diazótrofos, CBM, AcPh, celulolíticos, desnitrificantes, PMN y deshidrogenasa, vinculados en este caso al tratamiento con aplicación de BETA, siendo la que más peso tuvo según la tabla de autovectores ([Anexo 7](#)), las bacterias celulolíticas. Mientras que las variantes vinculadas a la ordenación en el CP 1 relacionado a parcelas control sin aplicación de BETA, fueron: AIPh, hidrolasa, hongos filamentosos, oxidantes de amonio, Solub. de P, PSRG y actinobacterias.

Tabla 5*Matriz de correlaciones de coeficientes de Spearman (r)*

	Hidrolasa	DHasa	AlPh	AcPh	CBM	BMA	HF	Act.	Celul.	Ox. de NH ₄ ⁺	Desnit.	Diazotrofos	IP	PSRG	Sol P B	
Hidrolasa																
DHasa	ns															
AlPh	0,67*	ns														
AcPh	ns	ns	ns													
CBM	ns	ns	ns	ns												
BMA	ns	ns	ns	ns	0,90*											
HF	ns	ns	ns	ns	ns	ns										
Act.	ns	ns	-0,83*	ns	ns	ns	ns									
Celul.	ns	ns	ns	0,64*	ns	ns	-0,83*	ns								
Ox. de NH ₄ ⁺	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns							
Desnit.	ns	ns	ns	0,75*	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
Diazotrofos	0,67*	ns	ns	0,69*	ns	ns	-0,94**	ns	ns	-0,74**	ns					
IP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,81**	ns	-0,91*	ns	ns	ns				
PSRG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
Sol P B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Nota: CBM: Carbono de la biomasa microbiana. BMA: bacterias mesófilas aerobias. HF: hongos filamentosos. Act.: Actinobacterias. DHasa: deshidrogenasas. AlPh: fosfatasa alcalina. AcPh: fosfatasa ácida. Celul.: celulolíticos. B Sol P: bacterias solubilizadoras de fósforo. Desn: desnitrificantes. IP: índice de patogenicidad del suelo. PMN: Potencial de Mineralización del Nitrógeno. PSRG: Proteínas del Suelo Relacionadas con Glomalina. Correlaciones significativas: ** (p<0.05), * (p<0.1), ns (no significativo), n=16.

IP disminuyó significativamente (p<0,05) con el tratamiento BETA (Tabla 3). Por lo tanto, una aplicación de BETA a mediano plazo, como en el caso de estudio, de 3 años, aumentó la capacidad de supresión de patógenos del suelo.

El IP se correlacionó significativamente (P<0.05) de forma positiva con Hongos filamentosos, seguramente la presencia de hongos patógenos en las parcelas sin tratar, explican esta alta correlación. La supresión de patógenos aumentó significativamente (p<0.1) en parcelas tratadas, por lo que evidentemente, mejoró la capacidad de supresión de patógenos del suelo, llevándolas a cabo seguramente las actinobacterias ya que su número aumentó en parcelas tratadas con BETA y los hongos disminuyeron (Tabla 3). Las actinobacterias han cobrado especial relevancia como la fuente más potente de antibióticos (Kandasamy *et al.* 2012) y otros metabolitos secundarios bioactivos (Solecka *et al.*, 2012) como posibles agentes de biocontrol.

De acuerdo con otros autores (Giacometti *et al.*, 2014, Haiming *et al.*, 2020), la fertilización con estiércol a largo plazo aumenta el CBM. El CBM se considera un componente activo de la reserva orgánica del suelo. Ren and Stefano (2000)

sugirieron que las relaciones Cmic: Corg obtenidas durante tratamientos a largo plazo también representan el equilibrio de C en el suelo. En este estudio, las bacterias y el CBM se correlacionaron significativamente de forma positiva con las bacterias mesófilas aerobias (Tabla 5). Los resultados obtenidos en ambos sitios indican que la aplicación de BETA aumentó el CBM pero no el COS total del suelo (Tabla 4) por lo tanto, los cambios en el carbono de la biomasa microbiana del suelo medidos durante períodos relativamente cortos pueden indicar las tendencias en el contenido total de materia orgánica mucho antes de que puedan detectarse mediante análisis químicos. Por lo tanto, el CBM como parámetro biológico involucrado en la mineralización del C del suelo debe monitorearse junto con el COS para predecir su estabilidad. Aunque muchos autores han reportado correlaciones positivas entre las actividades de las enzimas del suelo, la biomasa microbiana y los contenidos de materia orgánica (Wang *et al.*, 2011), no fue confirmado en este trabajo.

El CBM aumentó con la aplicación de BETA, pero no mostró diferencias significativas, debido quizás al valor alto de desvío estándar que presentan (Tabla3), de todas formas se evidencia una tendencia a aumentar su valor, que debería ser confirmada en otros ensayos con las mismas condiciones aquí propuestas. La realización de esta tesis, se enmarcó en un proyecto donde se incluyó otro predio vecino donde se realizó el mismo régimen de aplicación de BETA, pero por el intervalo de un año. En este trabajo (Montañez *et al.*, 2020), se puede apreciar esta tendencia al aumento, inclusive observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en el predio con y sin aplicación.

Hay que tener en cuenta también el efecto positivo de las pasturas sobre el suelo, si bien el muestreo se realizó en primavera, con maíz plantado, las coberturas vegetales que se rotaron previamente (Tabla 2) ayudaron probablemente a estabilizar la biomasa microbiana del suelo (Benintende y Benintende, 1996).

La fertilidad del suelo está relacionada con la actividad de grupos funcionales de microorganismos, con capacidad de suministrar directa o indirectamente nutrientes esenciales para las plantas, ya que están vinculados a los ciclos biogeoquímicos del N, P y C. Las tendencias en la biomasa microbiana y la funcionalidad no estuvieron acompañadas por un cambio en el tamaño de la población mesófila cultivable de bacterias, hongos y actinomicetos (Tabla 3). La

relación entre el N inorgánico y la actividad, las enzimas o las funciones microbianas del suelo no es directa porque el número de microorganismos representa el número de organismos microbianos mesófilos cultivables y no necesariamente los grupos activos o funcionales en el suelo.

El PMN aumentó significativamente en la parcela tratada ($p < 0.1$) (Tabla 3). Esas diferencias probablemente no se debieron a diferentes contenidos de N en el suelo, sino más bien a diferencias en la actividad microbiana estimulada por la aplicación del Biofertilizante (Qiu *et al.*, 2008). En este estudio, la abundancia de grupos funcionales estuvo influenciada por la aplicación del fertilizante orgánico, y éstas, incluida la aplicación de estiércol, modifican la relación C/N y la demanda de P para el desarrollo de la biomasa microbiana (Qiu *et al.* 2008; Luo *et al.*, 2018). La aplicación del Biofertilizante provocó aumentos significativos ($p < 0.05$) en el NMP de los organismos diazótrofos (fijadores de N y en la actividad de la enzima fosfatasa ácida (AcPh) (Tabla 3).

En general, la actividad microbiana cambia más rápidamente en respuesta al manejo que a la composición de la comunidad (Burger y Jackson, 2003). Estos resultados indican que el número de organismos aerobios mesófilos cultivables no muestra cambios consistentes con el tratamiento, aunque sí se registraron cambios cuantitativos de grupos funcionales en ambos sitios. Los microorganismos celulolíticos rompen las cadenas de celulosa en pequeñas unidades y la actividad mejorada de la comunidad celulítica por el tratamiento podría indicar una mayor rotación de hojarasca o de raíces en el suelo y, por lo tanto, una reserva de C más alta. Los microorganismos celulolíticos, de hecho, aportan mucho peso en el Biplot de componentes principales, a las parcelas tratadas con BETA (Figura 3).

Al mismo tiempo, el tratamiento también aumenta la presencia de organismos diazótrofos de forma significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3). Se espera un aumento en la demanda de N microbiano debido a la fertilización con BETA. Además, la producción de N_2O y N_2 se ve estimulada aún más por la adición de fuentes lábiles de C típicamente agregadas con fertilizantes de base orgánica como el estiércol (Zhou *et al.* 2013). El aumento de la fijación de N podría ser una consecuencia del aumento de la emisión de N con la aplicación de BETA (Asgedom *et al.*, 2014; Gao *et al.* 2016); por lo tanto, la actividad microbiana regularía la entrada y salida de N del sistema.

En este estudio, la composición de la comunidad microbiana explicó poca variación en comparación con la actividad enzimática potencial y los grupos funcionales. La plasticidad fenotípica de esta comunidad, en respuesta al tratamiento, puede ser alta, como sugiere la variación relativamente grande en las funciones de la comunidad microbiana del suelo. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el pH del suelo tratado y no tratado (Tabla 4). Muchos autores han sugerido que las enmiendas con estiércol pueden disminuir el pH del suelo, pero a largo plazo puede ralentizar este proceso de disminución de pH (Reardon *et al.*, 2022). Se sabe que el pH del suelo afecta la actividad y la biomasa microbiana, así como las proporciones relativas de bacterias y hongos (Pietri and Brookes, 2008, 2009).

Las actividades de cuatro enzimas (Hidrolasas, DHasa, ALPh, AcPh) aumentaron con la aplicación de BETA, y solo la AcPh mostró un incremento significativo ($p > 0.05$) (Tabla 3). Las actividades de las enzimas del suelo son indicadores importantes de los procesos microbiológicos y bioquímicos porque están involucradas en la descomposición de la materia orgánica del suelo, el ciclo y la disponibilidad de nutrientes, y en la biodegradación de contaminantes orgánicos tóxicos.

Estudios en ambientes templados han sugerido que las mediciones de la actividad de las enzimas del suelo son generalmente los indicadores más sensibles de los cambios en la comunidad microbiana subterránea a partir de diferentes prácticas de manejo (Nannipieriet *al.* 2002; Chaeret *al.*, 2009; Bowles *et al.*, 2014; Raiesi y Beheshti, 2014, Yang, 2022). Las actividades de enzimas específicas pueden cambiar según la composición de las enmiendas orgánicas y la disponibilidad relativa de nutrientes, así como otros factores, como el tipo de suelo. Estos resultados indican que la aplicación de BETA tiende a aumentar la actividad de las enzimas del suelo y este patrón podría ser el resultado de una mayor actividad microbiana estimulada por la enmienda de BETA. Al mismo tiempo, dado el nivel relativamente limitado de nutrientes del suelo, la actividad enzimática podría mejorar la disponibilidad de los nutrientes más limitantes para satisfacer las demandas metabólicas microbianas (Sinsabaugh *et al.*, 2008, Mooshammer *et al.*, 2014, Reardon *et al.*, 2022). Es así que, en esta línea, se pudo observar que la AcPh que aumentó significativamente en las parcelas tratadas con BETA (Tabla 3) y se correlacionó positivamente con los parámetros

microbiológicos que también mostraron un aumento significativo en las parcelas con tratamiento, Celulolíticos, diazótrofos, PMN y también desnitrificantes (que aumentaron, pero no de manera significativa). Al mismo tiempo se observó que sus vectores en el Biplot de PCA ([Figura 3](#)) explican la mayor variabilidad en el tratamiento con BETA, agrupándose según el componente 2 del Biplot con ángulos entre ellos cercanos a 0, por lo tanto, muy correlacionados, como ya se mencionó. También se puede ver que CBM también está correlacionado y aportando a la variabilidad de las parcelas con BETA. Es sabido que el CBM está relacionado con las actividades enzimáticas (Bowles *et al.*, 2014) aunque en la matriz de correlaciones no se apreciaron correlaciones significativas entre ellas, si se puede apreciar en el Biplot de PCA ([Figura 3](#)).

Para adaptarse a las limitaciones ambientales, los microorganismos tienen que compensar la regulación de la producción de enzimas extracelulares con una estrategia de adquisición de C y nutrientes o mejorando el metabolismo microbiano para su eficiencia en el uso de nutrientes. Este aumento significativo con el tratamiento con BETA de la actividad de AcPh (ligada al P orgánico), junto con el NMP de los microorganismos diazotrofos (fijación de N) y celulolíticos (C) podría indicar una respuesta microbiana a la deficiencia de P orgánico y cambios en la relación C/ N con el tratamiento para el desarrollo de biomasa microbiana. Estos pueden ayudar parcialmente a resolver la restricción de disponibilidad de recursos y explicar el aumento en la actividad enzimática.

La glomalina es un tipo especial de glicoproteína, producida específicamente por hifas y esporas de Hongos micorrícicos arbusculares y liberada al suelo después de la descomposición; está ampliamente distribuido, es hidrofóbica, insoluble y recalcitrante por naturaleza (Li *et al.*, 2022).

En el caso de PSRG, los resultados no mostraron un cambio significativo con el tratamiento con BETA ([Tabla 2](#)). Según Zhang *et al.*, (2014), las enmiendas orgánicas mejoran la estabilidad de los agregados del suelo a través del efecto positivo sobre los agentes aglutinantes del suelo, incluida la PSRG, pero al contrario de lo que se esperaba, estos resultados no mostraron cambios significativos en PSRG con el tratamiento.

Se puede encontrar en la bibliografía que se ha descrito a la glomalina como un componente principal del suelo en la formación de microagregados y el

mantenimiento de la estructura del suelo (Wright y Anderson, 2000; Emran *et al.*, 2012). Resultados de Wang H *et al.*, (2017) y Wang CY *et al.*, (2017) mostró que las actividades enzimáticas después de una enmienda de estiércol de 23 años condujeron a un aumento en los macroagregados (> 1 mm) pero no en los microagregados. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con BETA aumentó la actividad enzimática y el CBM, pero no la glomalina extraíble total. Esto puede indicar que la biomasa microbiana y la actividad enzimática no están vinculadas a la glomalina y está especialmente relacionada con la formación de microagregados (Six *et al.*, 2004).

5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

En este trabajo, la estrategia de muestreo y los parámetros microbianos utilizados revelaron información útil sobre los efectos de la aplicación de BETA, para éste fin se evaluaron los efectos de la aplicación de estiércol tratado aeróbicamente en un gran conjunto de parámetros microbianos del suelo.

La aplicación de BETA, tuvo efectos significativos en las propiedades biológicas del suelo, aumentando la biomasa microbiana, la actividad enzimática del suelo y la abundancia de microorganismos de diferentes grupos funcionales.

Entre los parámetros microbianos analizados, el CBM, la actividad enzimática de la AcPh, la abundancia de microorganismos diazótrofos, Celulolíticos, IP y PMN surgieron como indicadores razonables para evaluar y monitorear los efectos de la aplicación de BETA. Entre las variables fisicoquímicas, no surgieron diferencias en este trabajo

Estas variables fueron las más sensibles a la aplicación de la enmienda, y se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En el Biplot de PCA pudimos observar que el CBM se correlaciona con las variables relacionadas con el tratamiento, junto a los vectores de las variables que si presentaron diferencias significativas. También se observó que la COS se mantuvo estable mientras que el CBM tuvo tendencia al aumento, por lo que podríamos asumir que CBM permiten evaluar diferencias entre tratamientos o manejos anticipadamente a otras variables biológicas o físicas.

De todas formas, los diferentes tipos de suelos o fuentes de aplicaciones de enmiendas orgánicas necesitan más investigación. Sin un consenso actual sobre el conjunto mínimo de datos biológicos para evaluar el impacto de una práctica

de manejo en el suelo, estos estudios toman vital importancia a la hora de la toma de decisiones, en políticas de conservación y usos de suelos.

En cuanto a las perspectivas que surgen de los resultados de este trabajo, debería realizarse un seguimiento en el tiempo de estos indicadores seleccionados para evaluar su comportamiento, evaluándolos en otros ecosistemas con características de suelo diferentes y mediante aplicación y no aplicación de este producto u otros. De esta forma se podría evaluar su robustez como indicadores de salud de suelos. Entre ellos particularmente destaco el CBM para poder confirmar su tendencia al aumento en el tiempo con la aplicación del biofertilizante, midiendo esta variante, en parcelas con más años de aplicación del producto.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adam G, Duncan H, 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol Biochem* 33: 943-951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)

Altier N, Zerbino S, 2012. Indicadores biológicos para evaluar los agroecosistemas. 4. Comunidades microbianas. Índice de patogenicidad del suelo: Ejemplo para secuencias con leguminosas forrajeras. In: INIA; Programa Nacional Producción y Sustentabilidad Ambiental. Uso de la biodiversidad para la evaluación de impacto de la intensificación agrícola y el diseño de agroecosistemas sustentables, pp: 73-79. Las Brujas, Canelones (Uruguay).

Anuario estadístico agropecuario, MGAP, 2022. Disponible en: [file:///C:/Users/Acer/Downloads/O MGAP Anuario estad%C3%ADstico %202022-DIGITAL.pdf](file:///C:/Users/Acer/Downloads/O%20MGAP%20Anuario%20estad%C3%ADstico%202022-DIGITAL.pdf)

Asgedom H, Tenuta M, Flaten DN, Gao X, Kebreab E, 2014. Nitrous oxide emissions from a clay soil receiving granular urea formulations and dairy manure. *Agron J* 106 (2): 732-744. <https://doi.org/10.2134/agronj2013.0096>

Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey L H, & Baldani VLD, 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384, 413-431.

Benintende S, Benintende MC, 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. *Eco Indic* 52: 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.11.030>

Beringer JE, 1974. R Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84 (1): 188-198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>

Bogaard A, Fraser R, Heaton THE, Wallace M, Vaiglova P, Charles M, Jones G, Evershed RP, Styring AK, Andersen NH, Arbogast RM, Bartosiewicz L, Gardeisen A, Kanstrup M, Maier U, Marinova E, Ninov L y Schafer M, Stephan E, 2013. Crop manuring and intensive land management by Europe's first farmers. *P Nat Acad Sci* 110 (31): 12589-12594. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305918110>

Bowles TM, Acosta-Martínez V, Calderón F y Jackson LE, 2014. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across

an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biol Biochem* 68: 252-262.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.004>

Bünemann EK, Bongiorno G, Bai Z, Creamer RE, De Deyn G, De Goede R, Fleskens L, Geissen V, Kuyper TW, Mäder P, *et al.*, 2018. Soil quality - A critical review. *Soil Biol Biochem* 120 (Feb): 105-125. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>

Burger M, Jackson LE, 2003. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biol Biochem* 35 (1): 29-36. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00233-X)

Casida LE, Klein DA, Santoro T, 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci* 98 (6): 371-376. <https://doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>

Chaer G, Fernandes M, Myrold D, Bottomley P, 2009. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb Ecol* 58 (2): 414-424. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9508-x>

Chinnadurai C, Gopalaswamy G, and Balachandar D, 2014. Impact of long-term organic and inorganic nutrient managements on the biological properties and eubacterial community diversity of the Indian semi-arid Alfisol. *Arch Agron Soil Sci*, 60:531-548

Chodak M y Niklińska M, 2010. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. *Appl Soil Ecol* 46 (2): 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.08.002>

Chu H, Lin X, Fujii T, Morimoto S, Yagi K, Hu J y Zhang J, 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management, *Soil Biol. Biochem.* 39 (11): 2971 – 2976.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.031>.

D'Andrea PA y Medeiros MB, 2002 Biofertilizantes biodinâmicosna nutrição e proteção de hortaliças. *Congr Bras de Agricultura Organica, Natural, Ecologica e Biodiâmica*, 1. Anais. Piracicaba: Agroecológica; Ambrosano E (Coord.).

Decreto Ley N° 15239, 1982. Declaracion de interes nacional. Uso y conservacion de los suelos y de las aguas superficiales destinados a fines agropecuarios. *Registro Nacional de Leyes y Decretos: Tomo: 2, Semestre: 2, 1981 pp: 1976.*

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW, 2016. InfoStat. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>

Dong WY, Zhang XY, Dai X, Fu X, Yang F, Liu X, Sun X, Wen X y Schaeffer SM, 2014. Changes in soil microbial community composition in response to fertilization of paddy soils in subtropical China. *Appl Soil Ecol* 84: 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.06.007>

Dose HL, Fortuna AM, Cihacek LJ, Norland J, Desutter TM, Clay DE, Bell J, 2015. Biological indicators provide short term soil health assessment during sodic soil reclamation. *Ecol Indic* 58: 244-253. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.059>

Duran A, 1991. *Los suelos de Uruguay*, 2nd ed. Hemisferio Sur (1985).

Eash NS, Karlen DL y Parkin TB, 1994. Fungal Contributions to Soil Aggregation and Soil Quality. In *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (eds Doran JW, Coleman DC, Bezdicsek DF y Stewart BA). <https://doi.org/10.2136/sssaspeccpub35.c16>

Emmerling C, Schloter M, Hartmann A y Kandeler E, 2002. Functional diversity of soil organisms — a review of recent research activities in Germany 165 (4): 408-420. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200208\)165:4<408::AID-JPLN408>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<408::AID-JPLN408>3.0.CO;2-3)

Eivazi F, Tabatabai MA, 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem* 9 (3): 167-172. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(77\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(77)90070-0)

Emran M, Gispert M, Pardini G, 2012. Patterns of soil organic carbon, glomalin and structural stability in abandoned Mediterranean terraced lands. *Eur J Soil Sci* 63 (5): 637-649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2012.01493.x>

FAO, 1998. World reference base for soil resources. *World Soil Resources Report* 84 (1998).

FAO, 2008. An international technical workshop investing in sustainable crop intensification: The case for improving soil health, FAO, Rome: 22-24 July 2008. *Integrated Crop Management*, 6. Rome, Italy

FAO, 2009. *Glosario de agricultura orgánica*. Manual. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Rome, 2009. Disponible en: <https://www.fao.org/organicag/oag-glossary/es/>

FAO, 2013. *MANUAL DE COMPOSTAJE DEL AGRICULTOR*. Experiencias en América Latina. E-ISBN 978-92-5-307845-5, Glosario (FAOTERM), pp: 11. <file:///C:/Users/Acer/Downloads/i3388s-1.pdf>

FAO, 2015. *Carta Mundial de los Suelos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Viale delle Terme di Caracalla 00153 Rome, Italy. Disponible en: <http://www.fao.org/3/b-i4965s.pdf>.

FAO, ITPS, 2015a. *Status of the World's Soil Resources - Main report*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, 2015. Rome, Italy. <https://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>

FAO, 2015b. *Estimación de emisiones de gases de efecto invernadero en la agricultura*. Un manual para abordar los requisitos de los datos para los países en desarrollo.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, 2015.

Disponible en: <file:///C:/Users/Acer/Downloads/i4260s.pdf>

FAO, 2016. Voluntary guidelines for sustainable soil management. 155th Session of the FAO Council, Rome, Italy.

FAO, 2018. Nitrogen inputs to agricultural soils from livestock manure. New statistics, Integrated Crop, Management. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fincher GT, Monson WG & Burton GW, 1981. Effects of cattle feces rapidly buried by dung beetles on yield and quality of coastal Bermuda grass. *Agronomy Journal* 75: 775-779.

Filip Z, 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric Ecosyst Environ*, 88(2): 169 – 174. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00254-7)

Francioli D, Schulz E, Lentendu G, Wubet T, Buscot F, Reitz T, 2016. Mineral vs. Organic Amendments: Microbial Community Structure, Activity and Abundance of Agriculturally Relevant Microbes Are Driven by Long-Term Fertilization Strategies. *Front. Microbiol. Sec. Terrestrial Microbiology* 7 art. 1446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>

Frioni L, 2011. *Microbiología básica, ambiental y agrícola*, 1st ed. O. Gráfica, Buenos Aires, Argentina.

Gao JQ, 2006. The carbon accumulation and its response to climate change in Zoige Wetland Ecosystem of Qinghai-Tibet Plateau. PhD Dissertation, Inst Geogr Sci Nat Resour Res, Chinese Academy of Sciences.

Gao J, Xie Y, Jin H, Liu Y, Bai X, Ma D, Zhu Y, Wang Ch, Guo T, 2016. Nitrous oxide emission and denitrifier abundance in two agricultural soils amended with crop residues and urea in the North China Plain. *PLoS One* 11 (5): 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154773>

Gattinger A, Muller A, Haeni M, Skinner C, Fliessbach A, Buchmann N, Mäder P, Stolze M, Smith P, El-Hage Scialabba N, Niggli U, 2012. Enhanced top soil carbon stocks under organic farming. *P Natl Acad Sci* 109 (44): 18226-18231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209429109>

Gelderman RH, Beegle D, 1998. Nitrate-Nitrogen. In: Recommended chemical soil testing procedures for the North Central Region; Brown JR (ed.), pp: 17-20. Missouri Agric. Exp. Stn. Pub. No. 221.

Giacometti C, Cavani L, Baldoni G, Ciavatta C, Marzadori C, Kandeler E, 2014. Microplate-scale fluorometric soil enzyme assays as tools to assess soil quality in a long-term

agricultural field experiment. *Appl Soil Ecol* 75: 80-85.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.10.009>

Gil-Sotres F, Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Seoane S, 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol Biochem* 37: 877-887.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.003>

Govaerts B, Ken D, Sayre KD y Deckers J, 2006. A minimum data set for soil quality assessment of wheat and maize cropping in the highlands of Mexico. *Soil till Res* 87: 163-174.

<https://doi.org/10.1016/j.still.2005.03.005>

Griffiths BS, Ball BC, Daniell TJ, Hallett PD, Neilson R, Wheatley RE, Osler G y Bohanec M, 2010. Integrating soil quality changes to arable agricultural systems following organic matter addition, or adoption of a ley-arable rotation. *Appl Soil Ecol* 46: 43-53.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.012>

Haiming T, Xiaoping X, Chao, L, Xiaochen P, Kaikai C, Weiyan L y Ke W, 2020. Microbial carbon source utilization in rice rhizosphere and non-rhizosphere soils with short-term manure N input rate in paddy field. *Scientific Reports* **10**,

6487. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63639-8>

Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mäder P y Widmer F., 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J* 9:1177–1194

<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>

Huang X, Liu S, Wang H, Hu Z, Li Z, You Y, 2014. Changes of soil microbial biomass carbon and community composition through mixing nitrogen-fixing species with *Eucalyptus urophylla* in subtropical China. *Soil Biol Biochem* 73: 42-48.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.01.021>

INIA, 2020. Factores de emisión y coeficientes para estudios de huella de carbono en Uruguay: sector ganadero. Manual de consulta. Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA. e-ISBN: 978-9974-38-473-6.

Disponible en: <file:///C:/Users/Acer/Downloads/Libro-huella-de-carbono-1.pdf>

Irisarri, Pilar, 2009. Emisiones de metano y óxido nitroso: principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario en Uruguay/ed. Pilar Irisarri, Montevideo: Facultad de agronomía, 2009 pp. 79.

Jenkinson DS, y Ladd JN, 1981. Microbial Biomass in Soil: Measurement and Turnover. In E. A. Paul, y J. N. Ladd (Ed.), *Soil Biochemistry* (Vol. 5, pp. 415-471)

Kandasamy S, Muthusamy G, Thangaswamy S y Senthilkumar B, 2012. Screening and identification of antibiotic producing actinomycetes and their antagonistic activity against common pathogens. *World Res J Antimicrob Agents* 1 (1): 2320-3390.

Kaschuk G, Alberton O y Hungria M, 2011. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. *Plant Soil* 338: 467–481. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0559-z>

Klein DA, Sorensen DL y Redente EF, 1985. Soil enzymes: a predictor of reclamation potential and progress, in: Tate RL, Klein DA (Eds.). *Soil Reclamation Processes. Microbiological Analyses and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 273–340.

Köninger J, Lugato E, Panagos P, Kochupillai M, Orgiazzi A, Maria J.I. Briones J.I. Manure management and soil biodiversity: Towards more sustainable food systems in the EU, *Agricultural Systems*, (194) 103251, 2021 <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103251>

Leytem AB, Dungan RS, Bjorneberg DL, Koehn AC, 2011. Emissions of ammonia, methane, carbon dioxide, and nitrous oxide from dairy cattle housing and manure management systems. *J Environ Qual* 40 (5): 1383-1394. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0515>

Li Y, Xu J, Hu J, Zhang T, Wu X, Yang Y. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Glomalin Play a Crucial Role in Soil Aggregate Stability in Pb-Contaminated Soil. *Int J Environ Res Public Health*. 19(9):5029. doi: 10.3390/ijerph19095029.

Liu S, Wang J, Pu S, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y, Razavi BS, 2020. Impacto del estiércol en las propiedades bioquímicas del suelo: una síntesis global ciencia. *Entorno Total*. 745:141003.

Luo G, Ling L, Friman V, Guo J, Guo S, Shen Q, 2018. Organic amendments increase crop yields by improving microbe-mediated soil functioning of agroecosystems: A meta-analysis. *Soil Biol Biochem* 124: 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.002>

Marsh R. y Campling RC, 1970. Fouling of pastures by dung. *Herbage abstracts* 40:(2) pp 123-130.

Millot JC, Risso D y Methol R, 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Informe Técnico a la CHPA, Consultora FUCREA, Montevideo, Uruguay, 195 p.

Marinari S, Masciandaro G, Ceccanti B, Grego S, 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties, *Bioresour. Technol.*, 72(1):9-17, ISSN 0960-8524. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00094-2)

Martínez VR, 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas. XIII Congreso Científico del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.

McGuire KL y Treseder KK, 2010. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: decomposition as a case study. *Soil Biol Biochem* 42 (4): 529-535. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.016>

Molope MB y Page ER, 1986. The Contributions of Fungi, Bacteria and Physical Processes in the Development of Aggregate Stability of a Cultivated Soil, *Biological Agriculture Y Horticulture*, 3(2-3): 233-249. DOI: [10.1080/01448765.1986.9754473](https://doi.org/10.1080/01448765.1986.9754473)

Montañez, A., Rigamonti, N., Vico, S., Silva, C., Nuñez, L., & Zerbino, S. (2020). Influence of aerobic treated manure application on the chemical and microbiological properties of soil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(4), e1104. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019174-14658>

Mooshammer M, Wanek W, Hämmerle I, Fuchslueger L, Hofhansl F, Knoltsch A, Schneckner J, Takriti M, Watzka M, Wild B, 2014. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon: nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nat Commun* 5: 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4694>

Murphy D, Cookson W, Bainbridge M, Marshier, Jones D, Stockdale EA y Abbott LK, 2011. Relationships between soil organic matter and the soils microbial biomass (size, functional diversity, and community structure) in crop and pasture systems in a semi-arid environment. *Soil Res* 49: 582-594. CSIRO Publishing. <https://doi.org/10.1071/SR11203>

Muscolo A, Panuco MR, Calamaco C y Sudara M, 2014. Biological indicators to assess short-term soil quality changes in forest ecosystems. *Ecol Indic* 45: 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.04.047>

Muscolo A, Settineri G, Attinà E, 2015. Early warning indicators of changes in soil ecosystem functioning. *Ecol Indic* 48: 542-549. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.017>

Nair A, Ngouajio M, 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Appl Soil Ecol* 58: 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.03.008>

Nair R.P. 2014. Grand challenges in agroecology and land use systems. *Front Environ Sci*, 2: 1. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00001>

Nannipieri P, Grego S y Ceccanti B, 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry*, Volume 6 (eds J.-M. Bollag y G. Stotzky), pp. 293–355. Marcel Dekker, New York.

Nanniperi P, Kandeler E, Ruggiero P, 2002. Enzymes activities and microbial and biochemical process in soil. In: Enzymes in the environment: activity, ecology and applications; Burns RG and Dick RP (eds), pp: 1-33. Marcel Dekker, NY.
<https://doi.org/10.1201/9780203904039.ch1>

Nanniperi P & Eldor P, 2009. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2357–2369

Nanniperi P, Trasar-cepeda C, Dick RP, 2017. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biol Fertil Soils* 54 (5): 11-19. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1245-6>

Nautiyal CS, 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microb Lett* 170 (1): 265-270.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00555-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00555-2)

Nezomba H, Mtambanengwe F, Tittone P y Mapfumo P, 2015. Point of no return? Rehabilitating degraded soils for increased crop productivity on smallholder farms in Eastern Zimbabwe. *Geoderma* 239: 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.006>

Nogueira MA, Albino UB, Brandão-Jr O, Braun G, Cruz F, Dias BA, Duarte TD, Gioppo NMR, Menna P, Orlandi JM, Raimam MP, Rampazo LGL, Santos MA, Silva MEZ, Vieira FP, Torezan JMD, Hungria M y Andrade G, 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in Southern Brazil. *Agr Ecosyst Environ* 115 (1-4): 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.01.008>

Pagliari PH y Laboski C, 2012. Investigation of the inorganic and organic phosphorus forms in animal manure. *J Environ Qual* 41 (3): 901-910. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0451>

Pietri JC, Brookes PC, 2008. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. *Soil Biol Biochem* 40 (7): 1856-1861.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.020>

Pietri JC, Brookes PC, 2009. Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass, activity and community structure in an arable soil. *Soil Biol Biochem* 41 (7): 1396-1405. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.017>

Preem J, Truu J, Truu M, Mander U, Oopkaup K, Lõhmus K, Helmisaari H, Uri V, Zobel M y 2012. Bacterial community structure and its relationship to soil physico-chemical characteristics in alder stands with different management histories. *Ecol Eng* 49: 10-17.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.08.034>

Qin S, Hu C, He X, Dong W, Cui J, Wang Y, 2010. Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservational versus traditional

agricultural management. *Appl Soil Ecol* 45: 152-159.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.03.007>

Raiesi F, Beheshti A, 2014. Soil specific enzyme activity shows more clearly soil responses to paddy rice cultivation than absolute enzyme activity in primary forests of Northwest Iran. *Appl Soil Ecol* 75: 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.10.012>

Reardon CL, Klein AM, Melle CJ, Hagerty CH, Klarer ER, Machado S, ... y Wuest SB, 2022. Enzyme activities distinguish long-term fertilizer effects under different soil storage methods. *Applied Soil Ecology* 177, 104518.

Ren TZ, Stefano G, 2000. Soil bio-indicators in sustainable agriculture. *Sci Agric Sin* 33: 68-75.

Resolución N° 97/018, 2018. DGSA. Requisitos para el registro y control para la comercialización de insumos formulados a partir de materia prima de origen orgánico para uso agrícola. Unidad Ejecutora 4, M.G.A.P.- SERVICIOS AGRÍCOLAS.

<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-n-97018-dgsa-requisitos-para-registro-control-para>

Restrepo J, 2007. El ABC de la agricultura orgánica, fosfitos y panes de piedra. Colombia. Disponible en: <file:///C:/Users/Acer/Downloads/manual-practico-de-agricultura-organica-y-panes-de-piedra-1.pdf>

Roberson EB, Shennan C, Firestone MK y Sarig S, 1995, Nutritional Management of Microbial Polysaccharide Production and Aggregation in an Agricultural Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 59: 1587-1594.

<https://doi.org/10.2136/sssaj1995.03615995005900060012x>

Rufino MC, Tiftonell P, van Wijk MT, Castellanos-Navarrete A, Delve ARJ, de Ridder N y Giller KE, 2007. Manure as a key resource within smallholder farming systems: analysing farm-scale nutrient cycling efficiencies with the NUANCES framework. *Livest Sci* 112 (3): 273-287. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.09.011>

Saha S, Prakash V, Kundu S, Kumar N, Lal Mina B, 2008. Soil enzymatic activity as affected by long term application of farm yard manure and mineral fertilizer under a rainfed soybean-wheat system in N-W Himalaya. *Eur J Soil Biol* 44 (3): 309-315.

<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.02.004>

Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R (eds), 1996. *Methods in soil biology*, 1st ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60966-4>

Schloter M, Dilly O & Munch JC, 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric Ecosyst Environ* 98 (1-3): 255-262. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00085-9)

Schmidt EL, Belser LW, 1994. Autotrophic nitrifying bacteria. In: Methods of soil analysis. Part 2, Microbiological and biochemical properties, pp: 159-177. SSSA Book Series 5.2, Madison, WI, USA.

Schröder J, 2005. Revisiting the agronomic benefits of manure: a correct assessment and exploitation of its fertilizer value spares the environment. *Bioresour Technol* 96 (2): 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.015>

Shintani, M., Leblac, H., y Tabora, P. (2000). Tecnología tradicional adaptada para una agricultura sostenible y un manejo de desechos modernos. Guácimo (CR): Universidad EARTH. Guía para uso práctico, 1, 25. Disponible en: <file:///C:/Users/Acer/Downloads/bokashi-earth.pdf>

Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, *et al.*, 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol Lett* 11 (11): 1252-1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>

Six J, Bossuyt H, Degryze S, Deneff K, 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till Res* 79 (1): 7-31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>

Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A, 2012. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Open Life Sci* 7 (3): 373-390. <https://doi.org/10.2478/s11535-012-0036-1>

Sparling GP, Feltham CW, Reynolds J, West AW, Singleton P, 1990. Estimation of soil microbial C by a fumigation extraction method - Use on soils of high organic-matter content, and are assessment of the kec-factor. *Soil Biol Biochem* 22 (3): 301-307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90104-8)

Sradnick A, Murugan R, Oltmanns M, Raupp J, Joergensen RG, 2013. Changes in functional diversity of the soil microbial community in a heterogeneous sandy soil after long-term fertilization with cattle manure and mineral fertilizer. *Appl Soil Ecol* 63: 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.011>

Sutton M, 2011. Too much of a good thing. *Nature Comment* 472: 159-161. <https://doi.org/10.1038/472159a>

Thoumazeau A, Bessou C, Renevier MS, Trap J, Marichal R, Mareschal L, Decaëns T, Bottinelli N, Jaillard B, Chevallier T, Suvannang N, Sajjaphan K, Thaler P, Gay F, Brauman B, 2019. Biofunctool®: a new framework to assess the impact of land management on soil quality. Part A: concept and validation of the set of indicators, *Ecol Indic*, 97: 100 - 110. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.09.023>

Toth SJ, Prince AL, 1949. Estimation of cation-exchange capacity and exchangeable Ca, K and Na contents of soil by flame photometer techniques. *Soil Sci* 67 (6): 439-446. <https://doi.org/10.1097/00010694-194906000-00003>

Treonis AM, Erin E, Austin EE, Jeffrey S, Buyer JS, Jude E, Maul JE, Lori IPcer L, Inga A, Zasada IA, 2010. Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Appl Soil Ecol* 46 (1): 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.017>

Tubiello FN, Salvatore M, Rossi S, Ferrara A, Fitton N y Smith P, 2013. The FAOSTAT database of greenhouse gas emissions from agriculture. *Environ Res Lett* 8 (1): 015009. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/015009>

Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS, 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19 (6): 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)

Vida C, de Vicente A y Cazorla FM. The role of organic amendments to soil for crop protection: Induction of suppression of soilborne pathogens. *Ann Appl Biol*. 176:1– 15. <https://doi.org/10.1111/aab.12555>

Walkley A, Black IA, 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37 (1): 29-38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>

Wang Q, Li Y & Wang Y, 2011. Optimizing the weight loss-on-ignition methodology to quantify organic and carbonate carbon of sediments from diverse sources. *Environ Monit Assess* 174 (1-4): 241-257. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1454-z>

Wang CY, Hu N, Ge T, Kuzyakov Y, Wang ZL, Li Z, Tang Z, Chen Y, Wu C y Lou Y, 2017. Soil aggregation regulates distributions of carbon, microbial community and enzyme activities after 23-year manure amendment. *Appl Soil Ecol* 111: 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.015>

Wang H, Nie Y, Butterly CR, Wang L, Chen Q, Tian W, Song B, Xi Y y Wang Y, 2017. Fertilization alters microbial community composition and functional patterns by changing the chemical nature of soil organic carbon: A field study in a Halosol. *Geoderma* 292: 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.01.006>

Waring SA y Bremner JM, 1964. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature* 201(4922): 951-952. <https://doi.org/10.1038/201951a0>

Wei L., Chen Sh., Cui J., Ping H., Yuan Ch y Chen Q., 2022. A meta-analysis of arable soil phosphorus pools response to manure application as influenced by manure types, soil

properties, and climate, *Journal of Environmental Management*, 313:115006, ISSN 0301-4797, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115006>.

Wilkinson SC, Anderson JM, Scardelis SP, Tisiafouli M, Taylor A, Wolters V, PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress, *Soil Biol. Biochem.* 34 (2): 189 – 200. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00168-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00168-7)

Wright SF, Upadhyaya A, 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198 (1): 97-107.

Wright SF, Anderson RL, 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the central great plains. *Biol Fertil Soils* 31 (3-4): 249-253. <https://doi.org/10.1007/s003740050653>

Yakovchenko V, Sikora LJ y Kaufman DD, 1996. Un indicador de base biológica de la calidad del suelo. *Biología y Fertilidad de los Suelos*, 21, 245-251.

Yang B, Balazs KR, Butterfield BJ, Laushman KM, Munson SM, Gornish ES, y Barberán A, 2022. Does restoration of plant diversity trigger concomitant soil microbiome changes in dryland ecosystems? *J. Appl. Ecol.*, 59, 560–573. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14074>

Yang Q, Wang X, Shen Y, Philp JNM, 2013. Functional diversity of soil microbial communities in response to tillage and crop residue retention in an eroded Loess soil, *Soil Sci Plant Nutr*, 59 (3): 311-321. DOI: [10.1080/00380768.2013.775004](https://doi.org/10.1080/00380768.2013.775004)

Zaccardelli M, De Nicola F, Vilecco D y Scotti R, 2013. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *J Soil Sci Plant Nutr* 13 (3): 730-742. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162013005000058>

Zhang X, Wu X, Zhang S, Xing Y, Wang R y Liang W, 2014. Organic amendment effects on aggregate-associated organic C, microbial biomass C and glomalin in agricultural soils. *Catena* 123: 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.08.011>

Zhang Y, Hao X, Alexander TW, Ben W, Thomas BW, Shi X y Lupwayi NZ, 2018. Long-term and legacy effects of manure application on soil microbial community composition. *Biol Fertil Soils* 54:269–283. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1257-2>

Zhou X, Chen Ch, Wang Y, Xu Z, Duan J, Hao Y, Smaill S, 2013. Soil extractable carbon and nitrogen, microbial biomass and microbial metabolic activity in response to warming and increased precipitation in a semiarid inner Mongolian grassland. *Geoderma* 206: 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.04.020>

7. ANEXO

8.1.

Diluciones seriadas de suelo con suero fisiológico 0.85%

Se diluyen 8.5 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada. Autoclavar a 120°C, 20 minutos.

Se parte de 90 mL de suero fisiológico estéril adicionado con 360 µL de stock Tween 80* (dilución -1) con 10 g del suelo tamizado y se agita en vortex (120 rpm) a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se realizan diluciones seriadas (1/10) en tubos de 9 mL de suero fisiológico (1 en 9 mL).

De cada dilución, luego de vortexear vigorosamente, se toman 100 µL y se depositan en la superficie de la placa con el medio de cultivo. Se rastrilla hasta observar la absorción del líquido en el agar.

Dejar las placas invertidas en estufa a 28°C.

*Stock Tween 80: diluir 5 g en 200 mL de agua destilada. Concentración final: 0.01%

8.2.

Ty

Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
Agar	16,0 g
H ₂ O	c.s. p 1 L

Medio para hongos

Peptona	5,0 g
Glucosa	10,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
Agar	16,0 g
Sol. Rosa Bengala	1 MI stock*
H ₂ O	c.s.p. 1L

*Rosa Bengala stock 33 mg/mL

Medio Actinobacterias

Glicerina	10 g
Asparagina.H ₂ O	1,1 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,3 g
Agar	16,0 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

8.3.

Medio Mínimo

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
NaNO ₃	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g
FeSO ₄	0,01 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

8.4.

Medio NBRIP

Glucosa	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) SO ₄	0,1 g
Agar	16,0 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

8.5

Medio para crecimiento de microorganismos Oxidantes de amonio

***Sol.III	10 mL
(NH ₄) SO ₄	13,213 g
Bromothymol blue	0,020 g
*Sol I	1 mL
**Sol II	1 mL
H ₂ O	c.s.p. 1 L
pH 7,3 - 7,5 (ajustarlo con Na ₂ CO ₃ 0,5 M)	

***Sol. I** Quelato de hierro

Triplex III (EDTA.Na)	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,78 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

****Sol. II** Micronutrientes

Triplex III	0,5 g
H ₂ O	0,8 L
Agregar:	
H ₃ BO ₃	0,618 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,210 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,238 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,198 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,250 g

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144 g
NiSO ₄ .7H ₂ O	0,140 g
Ajustar a	1 L

*****Sol. III Macronutrientes**

K ₂ HPO ₄	4,354 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,232 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,368 g
H ₂ O	c.s.p. 0,25 L

Dispensar 4 mL en cada tubo y revelar con difenilamina sulfúrica (Difenilamina 10 g más ácido sulfúrico

1 L, se vierte sobre 0, 2 L de agua destilada).

Medio para crecimiento de microorganismos Desnitrificantes

Peptona	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
KNO ₃	1,5 g

Dispensar 4 mL de medio en tubos conteniendo campanas de Durham (asegurarse que no queden burbujas) y agregar 100 µL de las diluciones de suelo por triplicado.

Medios para crecimiento de microorganismos diazótrofos

iNFB

D- Acido málico	5,0 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,8 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
FeEDTA 1,64%	4 mL
Micronutrientes	2 mL
Vitaminas*	1 mL
Azul de bromotimol 0,5%	
en 0,2N de KOH	2 mL
Agar	1,8 g
Agua	c.s.p. 1 L
Ajustar pH a 5,8	

* diluir a baño de maría: 10 mg de biotina y 20 mg de piridoxal - HCl en 100 mL de agua destilada.

LGI

Sacarosa	5,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,26 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
FeEDTA 1,64%	4 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,01 g
Vitaminas*	1 mL
Azul de bromotimol 0,5% en 0,2N de KOH	5 mL
Agar	1,8 g
H ₂ O	c.s.p. 1L
Ajustar pH 6,8	

JMV

Manitol	5,0 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Micronutrientes	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
FeEDTA 1,64%	4 mL
FeCl ₃	0,01 g
Vitaminas*	1 mL
Azul de bromotimol 0,5% en 0,2N de KOH	5 mL
Agar	1,8 g
H ₂ O	c.s.p. 1L
Ajustar pH 4,5	

8.6. Autovectores (Figura 3)

Variables de clasificación

Columna1
Caso

Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	5,92	0,35	0,35
2	5,24	0,31	0,66
3	3,28	0,19	0,85
4	1,88	0,11	0,96
5	0,68	0,04	1,00
6	0,00	0,00	1,00
7	0,00	0,00	1,00
8	0,00	0,00	1,00
9	0,00	0,00	1,00
10	0,00	0,00	1,00
11	0,00	0,00	1,00
12	0,00	0,00	1,00
13	0,00	0,00	1,00
14	0,00	0,00	1,00
15	0,00	0,00	1,00
16	0,00	0,00	1,00
17	0,00	0,00	1,00

Autovectores

Variables	e1	e2
Hidrolasa	-0,21	0,08
AlPh	-0,24	-0,12
AcPh	0,38	0,11
CBM	0,16	0,03
Sol P B	-0,22	0,36
Celul.	0,40	0,05
Ox. de amonio	-0,26	0,30
Diazotrofos	0,29	0,21
IP	-0,27	-0,32
Glomalina	0,05	0,38
DHasa	0,09	-0,01
BMA	-0,06	-0,25
HF	-0,30	0,25
Act.	0,03	0,43
Sol P B1	-0,22	0,36
Desnit.	0,18	-0,06
PMN	0,33	0,14

8.7.

Medidas resumen

Columna1	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
Control s/BETA	Hidrolasa	4	9,18	0,75	8,07	9,64
Control s/BETA	DHasa	3	41,64	30,91	20,59	77,13
Control s/BETA	AlPh	4	5,63	3,68	2,15	10,66
Control s/BETA	AcPh	4	29,16	2,31	25,90	31,12
Control s/BETA	CBM	4	244,26	280,93	38,79	656,54
Control s/BETA	MAB	3	4,70	0,58	4,05	5,18
Control s/BETA	MAH	3	24,38	12,20	14,44	37,99
Control s/BETA	MAA	3	2,27	1,00	1,68	3,42
Control s/BETA	Celul.	4	14,14	15,82	1,88	36,54
Control s/BETA	Ox. de amonio	4	5,28	3,02	3,05	9,50
Control s/BETA	Ox. de nitritos	4	21,96	25,30	3,05	56,98
Control s/BETA	Desnit.	3	0,63	0,26	0,38	0,89
Control s/BETA	Diazotrofos	4	7,14	6,44	0,57	13,76
Control s/BETA	IP	4	0,76	0,07	0,65	0,80
Control s/BETA	Glomalina	4	69,80	4,30	66,48	75,66
Control s/BETA	Sol P B	4	7,96	5,76	2,44	13,76
Control s/BETA	PMN	3	25,04	0,80	24,49	25,96
Tratamiento c/BETA	Hidrolasa	4	9,52	0,84	8,48	10,49
Tratamiento c/BETA	DHasa	3	53,40	34,18	30,26	92,66
Tratamiento c/BETA	AlPh	4	6,21	4,55	2,43	12,31
Tratamiento c/BETA	AcPh	4	38,23	4,16	33,66	43,60
Tratamiento c/BETA	CBM	3	273,27	242,96	61,27	538,40
Tratamiento c/BETA	MAB	3	4,36	0,96	3,56	5,42
Tratamiento c/BETA	MAH	3	9,58	1,00	8,83	10,72
Tratamiento c/BETA	MAA	3	2,44	0,22	2,22	2,66
Tratamiento c/BETA	Celul.	4	231,82	99,39	145,11	367,78
Tratamiento c/BETA	Ox. de amonio	4	2,14	2,21	0,86	5,44
Tratamiento c/BETA	Ox. de nitritos	4	27,96	21,87	0,88	54,44
Tratamiento c/BETA	Desnit.	4	3,16	4,24	0,49	9,46
Tratamiento c/BETA	Diazotrofos	4	19,16	4,89	13,31	25,24
Tratamiento c/BETA	IP	4	0,63	0,04	0,60	0,68
Tratamiento c/BETA	Glomalina	4	69,07	2,45	66,15	71,57
Tratamiento c/BETA	Sol P B	3	2,88	0,37	2,46	3,15
Tratamiento c/BETA	PMN	3	32,92	5,19	29,77	38,91