

Cambios en las comunidades microbianas del suelo y sus consecuencias sobre el ciclado de N en respuesta a la fertilización y el pastoreo en pastizales de la Pampa Deprimida

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Ximena María López Zieher
Ingeniera Agrónoma - Universidad de Buenos Aires - 2014

Lugar de trabajo: IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,
CONICET



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Laura Yahdjian

Lic. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA, Argentina

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Agrarias, Argentina.

Co-directora

Lucía Vivanco

Lic. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA, Argentina

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas, Argentina.

Consejero

Marcelo Soria

Lic. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA, Argentina

Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas, Argentina.

JURADO DE TESIS

JURADO

Silvina Portela

Ingeniera Agrónoma (Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Magister en Horticultura (Universidad de California, Davis)

JURADO

Roberto Alvarez

Ingeniero Agrónomo (Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Eva Figuerola

Licenciada en Ciencias Químicas (Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires)

Doctorado en Química Biológica (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 29 de mayo de 2023

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Ximena María López Zieher

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Laura y Lucía, que me acompañaron en este largo camino de construir conocimiento y sus desafíos.

A mis padres, mi hermana, mis abuelos y a toda mi familia, en general, que siempre me apoyaron para que cumpla mis objetivos.

A mi bebé, que va a tener que dejarme defender esta tesis...

INDICE GENERAL

1. CAPÍTULO 1 - Introducción general	19
1.1. Problemas y antecedentes.....	20
1.1.1. El rol de los microorganismos del suelo	20
1.1.2. Cambio en el uso del suelo y la multifuncionalidad en pastizales	22
1.1.3. ¿Cómo entendemos el componente microbiano?.....	25
1.1.4. Contribución de los microorganismos al ciclado de nutrientes en el suelo 29	
1.1.5. Cambios esperados en los microorganismos del suelo y el ciclado de nutrientes con el agregado de nutrientes y el pastoreo	31
1.1.6. Evaluación de la multifuncionalidad de los ecosistemas	36
1.2. Objetivos generales	37
1.3. Sitio de estudio	38
1.4. Diseño experimental.....	41
1.5. Objetivos particulares y organización general de la tesis.....	43
CAPÍTULO 2. Comunidades microbianas del suelo en pastizales fertilizados y pastoreados.....	45
2.1 Introducción.....	46
2.2. Metodología.....	49
2.2.2. Muestras de suelo y extracción de ADN	50
2.2.3. Secuenciación y análisis de las comunidades microbianas	50
2.2.4. Análisis de diversidad y estadísticos	51
2.3. Resultados	52
2.3.1. Comunidades de bacterias en suelos fertilizados y pastoreados.....	53
2.3.2. Comunidades de hongos en suelos fertilizados y pastoreados	56

2.3.3. Relación de los efectos de la fertilización y el pastoreo sobre comunidades de plantas y microorganismos	59
2.3.4. Correlación con los factores ambientales	61
2.4. Discusión	62
CAPÍTULO 3 - Efecto de la fertilización, el pastoreo y su interacción sobre los principales procesos de ciclado de nitrógeno mediado por los microorganismos del suelo	66
3.1. Introducción.....	67
3.2. Metodología.....	74
3.2.2. Variables de respuesta	75
3.2.3. Análisis estadístico	81
3.3. Resultados	82
3.3.1. Efectos del pastoreo y la fertilización sobre las emisiones de óxido nitroso.	82
3.3.2. Efectos del pastoreo y la fertilización en la fijación biológica de nitrógeno.	86
3.4. Discusión	90
CAPÍTULO 4: Multifuncionalidad de los ecosistemas: más que la suma de sus partes	96
4.1. Introducción.....	97
4.2 Método.....	99
4.2.1 Índices de multifuncionalidad.....	99
4.2.2 Un marco conceptual renovado para los índices de MF: los servicios de soporte	102
4.3. Resultados del caso de estudio: multifuncionalidad del pastizal de la Pampa Deprimida bajo uso ganadero en escenarios de enriquecimiento con nutrientes	110
4.5. Discusión y Conclusiones	112
CAPÍTULO 5 - Discusión General	115
5.1. Introducción.....	116
5.2. Principales resultados obtenidos en esta Tesis	116
5.3. Significado e implicancias de estos resultados.....	119

5.3.1. Relevancia aplicada	119
5.4. Perspectivas futuras	127
5.4.1. Profundizar el conocimiento de las comunidades microbianas del suelo que permita vincular la identidad de los microorganismos con su función.....	128
5.4.2. Completar el presupuesto del C con énfasis en la emisión de metano	128
5.4.3. Desarrollar el aspecto social del índice de multifuncionalidad para su adopción como herramienta de manejo de ecosistemas	129
BIBLIOGRAFÍA	131
APENDICE A- CAPITULO 2	159
APENDICE B – CAPITULO 3	161
APENDICE C – CAPITULO 4	165

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Esquema general del efecto de dos factores del cambio global (introducción del ganado vacuno y aumento del N y P reactivo en el suelo) sobre la multifuncionalidad y los servicios ecosistémicos a través de cambios en la comunidad de plantas, de microorganismos del suelo y los procesos que ellos llevan a cabo. La introducción del ganado y el aumento de N y P en el suelo pueden alterar la comunidad microbiana de suelo en su composición y estructura, y por lo tanto cambiar su funcionamiento.....22
- Figura 1.2.** Ubicación del sitio de estudio dentro de la región de los pastizales del Río de La Plata. El punto naranja representa el sitio experimental en la Pampa Deprimida39
- Figura 1.3:** Diseño experimental del proyecto. Los principales factores son el pastoreo y los nutrientes, de lo que se desprenden los tratamientos sin agregado de nutrientes y con agregado de nutrientes (NPK+) en pastoreo y clausura al pastoreo respectivamente, en un diseño de parcelas divididas replicado en 6 bloques completos. La línea punteada representa el alambrado.....42
- Figura 2.1.** Abundancia relativa de la cantidad de secuencias encontradas correspondientes a los distintos filos bacterianos.52
- Figura 2.2.** Abundancia relativa de la cantidad de secuencias encontradas correspondientes a los distintos filos fúngicos.....53
- Figura 2.3.** Análisis de coordenadas principales basadas en las distancias de Weighted Unifrac para la comunidad de bacterias de suelo.....54
- Figura 2.4.** Diagramas de Venn para especies de a) bacterias y b) hongos. El primer valor indicado en cada área del diagrama corresponde al porcentaje de la cantidad de especies, mientras que el de abajo representa el porcentaje de las secuencias.....54
- Figura 2.5.** Abundancia relativa de las familias bacterianas presentes en cada tratamiento. Se menciona en la leyenda el nombre de la familia encontrada y en el caso de que el grupo fuera desconocido o sin nombre asignado, se utilizó el nombre del nivel taxonómico más cercano. En la leyenda se muestran en color azul los nombres de las familias que mostraron diferencias significativas entre tratamientos fertilizado y sin fertilizar. También se aclaró en violeta el género (“g”) al cual corresponde el organismo que originó esas diferencias significativas, ya que se trató de familias que tenían un único género representante.55
- Figura 2.6.** Análisis de coordenadas principales basadas en las distancias de Weighted Unifrac para la comunidad de hongos de suelo.57
- Figura 2.7.** Abundancia relativa de los géneros fúngicos presentes en cada tratamiento. Se menciona en la leyenda el nombre del género encontrado o en caso de que fuera desconocido o no asignado el nombre, se utilizó el nombre del nivel taxonómico más cerca que sí tuviera nombre. En la leyenda se colorearon en azul los nombres de las familias que mostraron diferencias significativas entre tratamientos de fertilización, y en verde los que mostraron diferencias entre tratamientos pastoreo y clausura.58

Figura 2.8. a) Análisis de coordenadas principales basado en Bray Curtis para la comunidad de plantas. b) Relación entre la coordenada principal 1 de plantas y la de bacterias. c) Relación entre la coordenada principal 1 de plantas y la de hongos. 60

Figura 2.9. Análisis Adonis para las matrices de distancia de Bray Curtis para Plantas, y de Weighted Unifrac para Bacterias y Hongos. Con asterisco se marcan los tratamientos que implicaron un % significativo de cambio ($p < 0.05$) dentro de cada grupo de organismos, mientras que con “.” se marcó lo marginalmente significativo ($p < 0.1$). 61

Figura 3.1. Ciclo de nitrógeno en agroecosistemas. Con círculos rojos se muestran los dos procesos, uno de entrada (la fijación biológica de nitrógeno por organismos de vida libre) y otro de salida de N (las emisiones de N_2O) de los pastizales bajo uso ganadero que fueron el foco de este estudio. Adaptado de *Silvia Pajares Moreno, OIKOS, septiembre-diciembre 2017, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Oikos 3.0, 2016*. 72

Figura 3.2. Detalle de la cámara de incubación conectada a la bomba de vacío para la toma de muestras de gases emitidos por el suelo. 76

Figura 3.3. Detalle del proceso de fijación biológica de nitrógeno a través de simbiosis con plantas (izquierda) o por organismos de vida libre (derecha). Adaptado de Brookhaven National Laboratory. 77

Figura 3.4. Detalle de una de las cámaras de incubación de suelo para el enriquecimiento de la atmósfera con acetileno. 78

Figura 3.5. Emisiones de óxido nitroso ($\mu gN m^{-2} h^{-1}$) en pastizales pastoreados y clausuras con tratamientos de adición de nutrientes (NPK+) y control sin fertilizar. El gráfico recuadro muestra las emisiones medias de óxido nitroso durante toda la temporada de crecimiento considerando únicamente el tratamiento de fertilización. 83

Figura 3.6. Fijación Biológica de Nitrógeno (BNF, $\mu gN.m^{-2}.h^{-1}$) en suelos de los pastizales pampeanos durante la época de crecimiento (octubre 2016 a abril 2017) en contexto de pastoreo y clausura, con y sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar en cada punto. Figura del recuadro: BNF acumulado durante la temporada de crecimiento. El asterisco en el panel inserto de arriba muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). 84

Figura 3.7. Mineralización neta de nitrógeno estimada en el laboratorio (panel izquierdo) y a campo (panel derecho). Las barras muestran valores medios ± 1 ES ($n=6$). No hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos en ninguno de los dos experimentos ($p > 0.05$). 86

Figura 3.8. Tasa de respiración de suelo medida durante la estación de crecimiento noviembre-marzo. Las fechas de medición coinciden con los muestreos a campo de fijación biológica de N y emisiones de óxido nitroso. Se encontró un efecto significativo de la fertilización ($p=0.037$) en el modelo que incluyó todas las fechas. El modelo

especifica que la emisión de CO₂ depende de la herbivoría y la fertilización y su interacción, más el efecto del mes como efecto fijo, mientras que en el efecto aleatorio se especifica la estructura de anidamiento de los datos considerando que es un experimento de parcelas divididas (CO₂.g.ha.h~Herbivoria*Fertilizacion+MES, random = ~1|Bloque/Herbivoria/Fertilización). Las barras muestran valores medios +1 ES (n=6).88

Figura 4.1. Publicaciones relacionadas con el tema multifuncionalidad en los últimos 15 años (base de datos Scopus). a) Cantidad de publicaciones en revistas indexadas. b) Porcentaje de publicaciones por área temática.....96

Figura 4.2. Conexión de los servicios ecosistémicos de soporte con los demás servicios de los ecosistemas. 104

Figura 4.3. Interconexión entre los servicios de soporte. La relación entre los servicios de soporte tiene que ver con 1) el agua disponible para la producción de plantas, 2) la absorción de agua de las plantas y la transpiración, 3) la calidad del suelo que determina la productividad de las plantas, 4) la calidad de la broza que determina la materia orgánica del suelo, 5) la diversidad de plantas y herbívoros puede cambiar la producción de biomasa vegetal, 6) la producción primaria neta es la fuente de energía para sostener la biodiversidad 7) la fauna y los microorganismos del suelo pueden aumentar la materia orgánica y el contenido de N del suelo, 8) la calidad del suelo condiciona el hábitat y los recursos disponibles para los microorganismos del suelo, 9) el agua disponible determina la biodiversidad, 10) el agua contenida en la biomasa viva y su liberación por heces y muerte , y 11) la erosión del suelo por precipitación y el lixiviado de nutrientes.....103

Figura 4.4. Servicios intermedios seleccionados para el caso de estudio del pastizal bajo uso ganadero en la Pampa Deprimida, establecimiento “Las Chilcas”, Pcia de Bs As...107

Figura 4.5. Gráfico de tela de araña representando las funciones ecosistémicas consideradas en el nuevo índice de multifuncionalidad propuesto (MF). Los valores de todas las variables fueron estandarizados. HUM: humedad gravimétrica del suelo, NDVI: índice de NDVI, LIT: biomasa de broza, N₂O: óxido nitroso emitida por el suelo, C:N: relación C:N del suelo, CO₂: emisión de dióxido de carbono del suelo por respiración, FBN: fijación biológica de nitrógeno, LEG: abundancia de leguminosas, FES: cobertura de festuca, RICH: riqueza de plantas.....110

Figura 5.1. Ciclo del nitrógeno en un pastizal nativo pastoreado en la Pampa Deprimida sin fertilización (primer número) y en el escenario con fertilización (números entre paréntesis). Las reservas de nitrógeno están representadas por recuadros (gN m⁻²) y las flechas muestran los flujos de nitrógeno (gN m⁻² d⁻¹) en la época de máxima productividad de las plantas (diciembre-abril, 150 días). Los asteriscos indican flujos o reservorios que cambiaron significativamente con la fertilización (p < 0.05). Las estimaciones de Fijación de N provienen de la fijación de bacterias de vida libre. En el Cuadro 5.1 se detallan las fuentes de datos y los cálculos realizados.....119

Figura 5.2. Ciclo del nitrógeno en un pastizal en la Pampa Deprimida excluyendo el ganado (primer número) y con ganado (números entre paréntesis), sin fertilización en ambos casos. Los reservorios de nitrógeno están representadas por recuadros (gN m⁻²) y las flechas muestran los flujos de nitrógeno (g N m⁻² d⁻¹) durante la época de máxima

productividad de las plantas (diciembre-abril, 150 días), excepto la carga de ganado y la exportación que son anuales. Los asteriscos indican flujos o reservorios que cambiaron significativamente con la exclusión del ganado ($p < 0.05$). Las estimaciones de Fijación de N provienen de la fijación de bacterias de vida libre. En el Cuadro 5.1 se detallan las fuentes de datos y los cálculos realizados. 121 [20](#)

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Características ecológicas de las comunidades de microorganismos del suelo.	26
Cuadro 2.1. Abundancia relativa de las 6 familias bacterianas que mostraron cambios significativos por tratamiento. Se muestra también el valor de p (significancia) para el tratamiento de fertilización y el porcentaje de cambio producto de la fertilización con NPK.....	55
Cuadro 2.2. Índices de diversidad (Riqueza, Shannon y Pielou) para la comunidad de bacterias de suelo del pastizal estudiado para los distintos tratamientos. Se presenta el valor promedio, el error estándar (n=6) y el valor asociado del análisis estadístico de Kruskall Wallis.....	56
Cuadro 2.3. Índices de diversidad (Riqueza, Shannon y Pielou) para la comunidad de hongos del pastizal estudiado para los distintos tratamientos. Se presenta el valor promedio y el error estándar (n=6) y en la última columna el valor asociado del análisis estadístico de Kruskall Wallis.....	58
Cuadro 3.2. Reservorios de nitrógeno del suelo medidos al final del experimento (marzo 2017) en muestras de suelo extraídas de los primeros 10 cm. Los valores muestran valores medios ± 1 ES (n=6). No hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos (p>0,05).89	
Cuadro 4.1. Análisis bibliográfico de las formas más usadas para calcular índices de multifuncionalidad y las funciones ecosistémicas consideradas.....	100
Cuadro 4.2. Indicadores posibles de las distintas funciones ecosistémicas incluidas en los servicios de soporte.	106
Cuadro 4.3. Resumen de los índices tradicionales (SD basado en el desvío estándar, y M basado en los máximos, ver cálculos en Cuadro 4.1) y el nuevo índice de funcionalidad propuesto en este trabajo (MF, con los 4 subíndices relacionados a los servicios de soporte: planta, agua, suelo y biodiversidad). Los análisis con cada índice se realizaron para el total de 18 funciones y para dos casos de reducción en un 25 (13 funciones) y 50% (9 funciones) de las funciones consideradas en el cálculo del índice. Las letras diferentes indican diferencias significativas en el índice para los distintos tratamientos. Se marcó en rojo los valores máximos y en azul, los mínimos, comparando entre los tratamientos.111	
Cuadro 5.1. Selección de datos y especificaciones de cálculos realizados para obtener el presupuesto del ciclo de nitrógeno completo en los pastizales de la Pampa Deprimida bajo uso pastoreo y clausuras en escenarios de aumento de nutrientes, presentado en las figuras 5.1 y 5.2 respectivamente. En negrita se muestran los procesos o atributos que se modificaron significativamente (P<0,05) con la exclusión del pastoreo o la fertilización. NA: no aplicable.	125

ABREVIATURAS

BM: biomasa microbiana

C: carbono

FBN: fijación biológica de nitrógeno

g: gramo

h: hora

ha: hectárea

K: potasio

kg: kilogramo

ln: logaritmo natural

log: logaritmo

m: metro

MF: multifuncionalidad

MOAM: Materia Orgánica Asociada a Minerales

MOP: Materia Orgánica Particulada

N: nitrógeno

N₂O: óxido nitroso

P: fósforo

PPNA: productividad primaria neta aérea

s: segundo

µg: nanogramo

RESUMEN

Los microorganismos del suelo tienen un papel central en la regulación de los ciclos biogeoquímicos, por lo que es crucial entender cómo este grupo diverso de pequeños seres responden a los cambios ambientales inducidos por las actividades humanas. El aumento en la disponibilidad de nutrientes en el suelo por fertilización o deposiciones atmosféricas y la introducción de la ganadería en pastizales naturales son dos manejos de pastizales comunes en todo el mundo con consecuencias desconocidas en los procesos del suelo. El objetivo de esta tesis fue evaluar los efectos del aumento en la disponibilidad de nutrientes y el pastoreo por ganado sobre la estructura y los procesos de las comunidades microbianas del suelo, y sobre la multifuncionalidad de pastizales. Se realizó un experimento factorial a campo de largo plazo de agregado de nutrientes y exclusión del ganado en un pastizal de la Pampa Deprimida (de gran importancia ganadera para Argentina), y se evaluaron los efectos en la diversidad de las comunidades microbianas del suelo y en procesos claves del ciclo de carbono y nitrógeno. La información generada se integró en un nuevo índice de multifuncionalidad del ecosistema que se propone en esta tesis para evaluar prácticas de manejo.

El análisis de las comunidades microbianas de suelo mostró que el agregado de nutrientes altera significativamente la composición de las comunidades de bacterias y hongos mientras que el pastoreo sólo genera cambios marginales en la comunidad fúngica. Por otra parte, en cuanto a los procesos de suelo mediados por los microorganismos, se encontró que la adición de nutrientes aumentó las emisiones de N_2O del pastizal inmediatamente después de fertilizar pero el efecto no se mantuvo en el tiempo, mientras que la exclusión del ganado no tuvo efectos en este proceso. A su vez, la fijación de N aumentó en un contexto enriquecido en nutrientes sólo con el ganado presente. El nuevo índice de multifuncionalidad que se propuso resultó ser útil para representar los procesos ecosistémicos y evaluar el impacto de disturbios. En el pastizal estudiado, este índice arrojó resultados interesantes que permiten concluir que no es recomendable excluir al ganado puesto que su presencia controla a la especie vegetal dominante que es la exótica invasora *Schedonorus arundinaceus*, y se podría considerar la posibilidad de fertilizar el pastizal bajo uso ganadero para conseguir mayor producción de forraje.

En conclusión, esta tesis permitió determinar la magnitud y la dirección del cambio de las comunidades microbianas del suelo y los principales procesos del ciclo de nitrógeno frente a prácticas de manejo en los pastizales aportando conocimiento para mejorar el uso y la conservación de dichos ecosistemas.

Palabras claves: bacterias y hongos de suelo, fertilización, ganado doméstico, fijación biológica de nitrógeno, emisión de óxido nitroso, multifuncionalidad, Región pampeana.

ABSTRACT

Soil microorganisms have a central role in the regulation of biogeochemical cycles, so it is crucial to understand how these small and diverse beings respond to environmental changes induced by human activities. The increase in the nutrient availability in the soil by fertilization or atmospheric depositions and the introduction of livestock in natural grasslands are two common grassland managements around the world with unknown consequences on soil processes. The objective of this thesis was to evaluate the effects of increased nutrient availability and cattle grazing on the structure and processes of soil microbial communities, and on grassland multifunctionality. A long-term factorial field experiment of nutrient addition and livestock exclusion was carried out in a grassland of the Flooded Pampa (of great importance for livestock in Argentina), and the effects on the diversity of soil microbial communities and on the key soil processes of the carbon and nitrogen cycle were evaluated. The information generated was integrated into a new ecosystem multifunctionality index that is proposed in this thesis to evaluate management practices.

The analysis of soil microbial communities determined that the addition of nutrients significantly altered the composition of the bacterial and fungal communities, but grazing only generated marginal changes in the fungal community. On the other hand, regarding soil processes mediated by microorganisms, it was found that the addition of nutrients increased N₂O emissions from the grassland, but the exclusion of livestock had no effect on this process. In turn, N fixation increased in a nutrient-enriched context with cattle present. The new multifunctionality index that was proposed turned out to be useful to represent ecosystem processes and evaluate the impact of disturbances. In the grassland studied, this index yielded interesting results that allow us to conclude that it is not advisable to exclude cattle, since it controls the dominant invasive and exotic plant *Schedonorus arundinaceus*, and to consider the possibility of fertilizing the grassland under livestock use to maximize forage production.

In conclusion, this thesis made it possible to determine the magnitude and direction of change in soil microbial communities facing management practices in grasslands while providing knowledge to improve management and conservation strategies for these ecosystems.

Keywords: soil bacteria and fungi, fertilization, domestic livestock, biological nitrogen fixation, nitrous oxide emission, multifunctionality, Pampas Region.

1. CAPÍTULO 1 - Introducción general

1.1. Problemas y antecedentes

1.1.1. El rol de los microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo tienen un rol clave en los ecosistemas terrestres, pues son responsables de procesos que permiten la vida en la Tierra. Muchos microorganismos del suelo son responsables de descomponer la biomasa muerta permitiendo el ciclado de la materia, tal que las plantas puedan tomar esos nutrientes nuevamente y seguir convirtiendo la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis. Desde un punto de vista antropocéntrico, los microorganismos son esenciales para el mantenimiento de los servicios que los ecosistemas brindan a los seres humanos, que son beneficios que los seres humanos perciben de modo directo, como la producción de alimentos, la provisión el agua limpia, la regulación de las enfermedades y el clima, y la formación de suelos, entre otros (Bongaarts 2019). Mayormente estos diminutos seres aportan funciones ecosistémicas que contribuyen a servicios que son clasificados como “servicios de soporte”, que son aquellas estructuras y procesos que sirven de base para la provisión del resto de los servicios ecosistémicos como el mantenimiento de la fertilidad del suelo, la regulación del clima a través del secuestro de carbono (que depende del balance entre los flujos de entrada de carbono a través de la productividad primaria y los flujos de salida a través de la descomposición de la materia orgánica), la formación y estructura del suelo, entre otros (Daily et al. 1997, Sala et al. 2017).

Las actividades agrícolas y ganaderas también dependen de los microorganismos del suelo, puesto que se sostienen en gran medida en aspectos claves de la multifuncionalidad de los ecosistemas como son la fertilidad física y química del medio en que se desarrollan (Prashar et al. 2014). El servicio de provisión de forraje, uno de los más importantes en las tierras de pastoreo, depende en forma indirecta de los microorganismos del suelo. Sin embargo, el avance de la frontera agrícola y la intensificación de las prácticas agropecuarias han ocurrido desconociendo en gran medida su impacto sobre las comunidades microbianas y los procesos del suelo que llevan a cabo. La intensificación de las prácticas agropecuarias a nivel global ha implicado, por ejemplo, el incremento en el uso de fertilizantes, aumentando considerablemente el nitrógeno (N) y el fósforo (P) reactivo en el suelo, ya que gran parte del fertilizante aplicado en

agricultura es utilizado con baja eficiencia, alterando la biodiversidad de plantas y microorganismos y llevando incluso a problemas de enriquecimiento nutricional (Tilman et al. 2002, 2011, Bennett and Elser 2011). También las deposiciones globales de N han aumentado por el uso de combustibles fósiles y la producción ganadera (Vitousek et al. 1997a, Erisman et al. 2013). En el caso de la Región Pampeana se esperan aumentos de las deposiciones de N para el 2050 de $5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Galloway et al. 2008, Stevens et al. 2015). En la actualidad en la región no hay un aporte de P importante, sino lo contrario, se sospecha que hay un déficit de P por la falta de una fertilización que compense las exportaciones en carne y forraje de los agroecosistemas. Sin embargo, el aumento global del N y P reactivo en los suelos es un escenario de interés para estudiar el cambio en las redes tróficas como consecuencia de los cambios en el uso de la tierra tienen efectos sobre los microorganismos del suelo, alterando los procesos de ciclado del carbono y nitrógeno. Por ejemplo, el aumento del N reactivo en el suelo puede reducir la abundancia de microorganismos fijadores de N (Van Raalte et al. 1974, Salvaggiotti et al. 2008) y, en última instancia, alterar la multifuncionalidad de los ecosistemas y los servicios ecosistémicos como el mantenimiento de la biodiversidad, la producción de forraje, el secuestro de carbono, entre otros (Fig.1, adaptado de Brussaard et al., 2007). En esta tesis, se hipotetiza que el aumento de nutrientes (NPK y micronutrientes) en un pastizal de la Pampa Deprimida podrían homogeneizar el ambiente edáfico al no haber limitación por los nutrientes incorporados y, consecuentemente, homogeneizar a las comunidades microbianas del suelo (López Zieher et al 2020). Estos cambios podrían repercutir sobre ciertos procesos relacionados al ciclado de N y P, en primera instancia, aumentando la disponibilidad de dichos nutrientes en el suelo y los flujos de pérdida. En consecuencia, se alterarán las interacciones entre las plantas modificando la composición de especies y el funcionamiento de la comunidad vegetal.

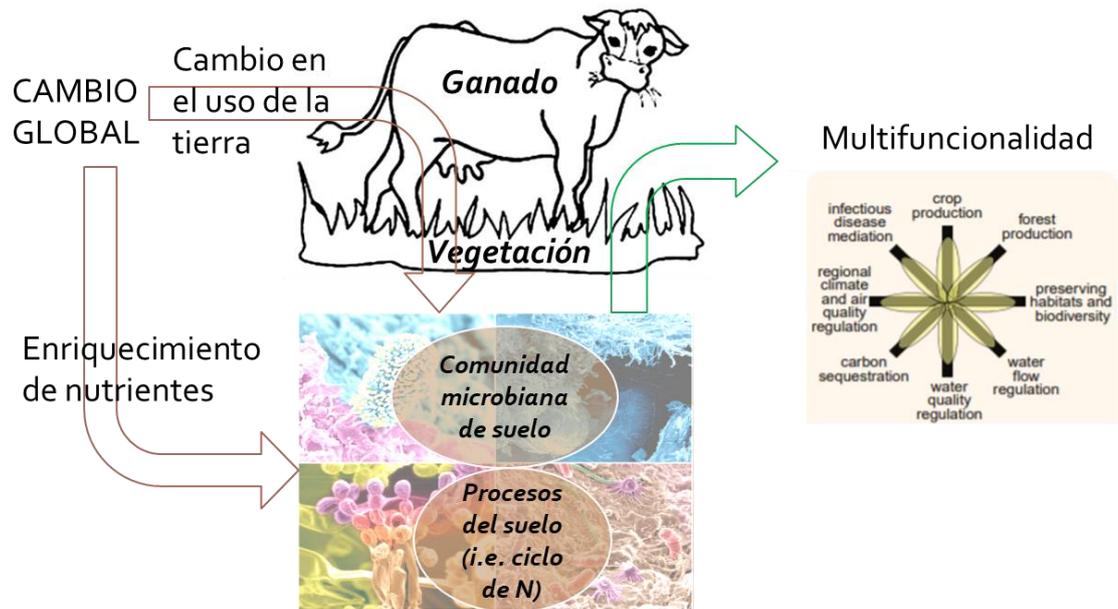


Figura 1.1. Esquema general del efecto de dos factores del cambio global (introducción del ganado vacuno y aumento del N y P reactivo en el suelo) sobre la multifuncionalidad y los servicios ecosistémicos a través de cambios en la comunidad de plantas, de microorganismos del suelo y los procesos que ellos llevan a cabo. La introducción del ganado y el aumento de N y P en el suelo pueden alterar la comunidad microbiana de suelo en su composición y estructura, y por lo tanto cambiar su funcionamiento.

1.1.2. Cambio en el uso del suelo y la multifuncionalidad en pastizales

El ser humano ha impulsado en mayor o menor medida cambios ambientales y ecológicos a escala planetaria. De hecho, ya en los años 90 Vitousek y colaboradores afirmaban que no había ecosistema en la Tierra que estuviera libre de la influencia humana (Vitousek et al. 1997b), con la preocupación subyacente de que estos cambios podían alterar la capacidad de la Tierra para sostener la vida (Foley et al. 2005). La población humana para su crecimiento utiliza cada vez más recursos de la naturaleza, expandiendo el área terrestre dedicada a la agricultura, la industria y las urbes a expensas de los ecosistemas naturales, fenómeno que se conoce como cambio en el uso de la tierra. Estos cambios, a su vez, se retroalimentan con los otros componentes del cambio global: el cambio climático (calentamiento global, mayor frecuencia de eventos extremos,

deshielos, etc.); los cambios en la composición atmosférica (aumento de concentración de los principales gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO_2), el óxido nitroso (N_2O) y el metano (CH_4)); los cambios en la biodiversidad (extinciones, invasiones biológicas, etc.); y los cambios biogeoquímicos (alteraciones en el ciclado del carbono, nitrógeno, agua). Por ejemplo, al pastorear un pastizal natural podría producirse una mayor emisión de CO_2 y otros gases de efecto invernadero a la atmósfera, alterando el normal ciclado del carbono. La bibliografía al respecto exhibe resultados variables donde no siempre el disturbio de la ganadería produce aumentos en la emisión de CO_2 . Sin embargo, podríamos hipotetizar que un aumento en la tasa de respiración del suelo del pastizal bajo uso ganadero podría ser consecuencia del consumo de plantas de los animales, que produce aumentos en la actividad de las raíces (Dyer et al. 1982) y la muerte radical (Lemaire et al. 2000). Estos cambios en las raíces generan mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo, lo que debería reflejarse también en un aumento de la actividad microbiana, con aumentos en la respiración de suelo (Zhou et al. 2016). Si este cambio en el uso de la tierra se da en grandes superficies y no es compensado por un mayor secuestro de C, la concentración de CO_2 en la atmósfera aumenta, lo que promueve el efecto invernadero aumentando la temperatura del aire. La pérdida de servicios a escala local, que en este ejemplo sería el secuestro de C que se ve reducido por el pastoreo, termina convirtiéndose en un problema global.

Uno de los ecosistemas terrestres más afectado por el cambio en el uso de la tierra son los pastizales (Hoekstra et al. 2005). Estos ecosistemas son de particular importancia porque representan un tercio de la producción primaria neta aérea terrestre (Stuart Chapin et al. 2011). En otras palabras, la posibilidad de apropiación humana de la producción primaria es muy alta en los pastizales. Su productividad es posible gracias al funcionamiento ecosistémico que involucra muchos procesos simultáneos e interdependientes que llevan a cabo la biota del suelo y las plantas en la interfaz física (suelo, agua, aire), y que brindan lo que llamamos “multifuncionalidad”, que permite la provisión de servicios ecosistémicos como la provisión de forraje y cultivos. No es extraño, entonces, que los pastizales del Río de la Plata, dentro de los cuales están los pastizales de la Pampa Deprimida estudiados en este trabajo, estén altamente

antropizados, transformados con fines agrícolas o ganaderos, y sean muy escasas las áreas conservadas (menos del 2%, Baldi and Paruelo 2008). Los pastizales del Río de la Plata abarcan un área de casi un millón de hectáreas y comprenden tres de los cuatro países que integran el tratado del Mercosur: Uruguay, Brasil y Argentina. Sin embargo, la población rural es baja, lo que implica que la producción es transportada del campo a la ciudad, e incluso muchos de los bienes agrícola-ganaderos son exportados hasta los lugares más remotos del mundo. Las consecuencias del uso agrícola-ganadero de los pastizales son la pérdida de biodiversidad, la erosión y la exportación de nutrientes (Viglizzo et al. 2011). En el caso particular del ciclado del nitrógeno, como este elemento se exporta con la cosecha de los cultivos y la carne desde la Región Pampeana hacia el mundo, los países como Argentina y Brasil se convierten en exportadores netos de N, ya que la producción agrícola-ganadera se hace a costa del N del suelo, con uso insuficiente o nulo (en el caso de los pastizales para ganadería) de fertilizante nitrogenado (Oita et al. 2016). En cuanto a la lixiviación de N, el uso excesivo o incorrecto de fertilizantes nitrogenados, en momentos de lluvia o cuando las plantas no pueden fijarlo. Sin embargo, el bajo uso de fertilizantes en la Pampa Deprimida en la actualidad explica que no haya evidencia de lixiviación en esta región (Portela et al. 2006). Por otra parte, los largos períodos de barbecho sin cultivo podrían promover la pérdida de N del suelo por lixiviación (Sanchez-Martin et al. 2010) y la emisión de gases como el óxido nitroso (Caride et al. 2012, Della Chiesa et al. 2019). En cuanto a los ingresos de N al sistema, descontando la fertilización nitrogenada, el cambio en el uso de la tierra también implica cambios en la fijación biológica del N determinando aumentos o disminuciones de las entradas de este nutriente esencial para las plantas (Tognetti et al. 2021). Por ejemplo, las reducciones en la fijación son muy evidentes en los pastizales donde la alta presión de pastoreo perjudica a las leguminosas (Ritchie and Tilman 1995), mientras que la interseembra con leguminosas o las áreas en las que se siembra soja inoculada, la fijación de N aumenta. Por otra parte, las deposiciones atmosféricas de N sobre los pastizales pampeanos parecen relativamente bajas comparadas con las regiones más industrializadas del planeta (Galloway et al. 2008), pero están aumentando por lo que su impacto en los ecosistemas naturales podría disparar una consecuencia indeseada para el funcionamiento del ecosistema (Stevens et

al. 2015). Por ejemplo, los nutrientes pueden ocasionar una cascada de pérdida de biodiversidad, ya que alteran las jerarquías competitivas entre especies de plantas, favoreciendo a las más competitivas y produciendo exclusión competitiva de las menos aptas. Los cambios ecosistémicos antes mencionados en la vegetación repercuten en las comunidades de los niveles tróficos por arriba de las plantas: herbívoros y carnívoros (Jones et al. 2014), y en las comunidades del suelo (Leff et al. 2015), por lo que sería conveniente anticiparse a los efectos que podría tener las mayores deposiciones de nutrientes en el suelo en nuestros pastizales. En consecuencia, el monitoreo de los flujos de N permitiría identificar alteraciones frente al cambio en el uso de la tierra, lo que resulta fundamental para idear estrategias de manejo tendientes a reducir la contaminación del ambiente y asegurar la provisión de servicios ecosistémicos, en especial en aquellos pastizales más frágiles como los de la Pampa Deprimida.

1.1.3. ¿Cómo entendemos el componente microbiano?

El campo de la ecología microbiana ha avanzado enormemente en las últimas décadas, permitiéndonos echar luz en lo que hasta muy poco se trataba como una caja negra llamada “microorganismos del suelo” (Allison and Martiny 2008, Fierer and Lennon 2011). Mediante las técnicas microbiológicas tradicionales sólo se podía vislumbrar un escaso 1-5% de la biodiversidad total de los microorganismos del suelo, ya que no se podían evaluar los microorganismos no cultivables. Las técnicas moleculares de estudio de las comunidades microbianas, sin el sesgo que imponen los métodos del cultivo e incubación, han permitido vislumbrar la verdadera diversidad de estos seres vivos, que resultó ser mucho mayor y filogenéticamente más compleja que la percibida con las técnicas tradicionales (Pace et al. 1986). A su vez, se ha evidenciado que en los suelos hay gran diversidad de microorganismos poco abundantes (raros) que, en conjunto, representan un gran porcentaje de la abundancia total y que además podrían ser funcionalmente muy importantes. El paradigma histórico que sugería que los microorganismos son ubicuos, que “todas las especies están en todos lados” (Beijerinck 1913), y que por lo tanto existe una gran redundancia funcional que garantiza los procesos biogeoquímicos de suelo en todos los ecosistemas, ha sido cuestionado desde hace varios

años (Fierer et al. 2013). De hecho, ya existe evidencia de que la pérdida de diversidad de microorganismos del suelo tiene consecuencias funcionales sobre los ecosistemas (Philippot et al. 2013, Singh et al. 2014), lo cual es preocupante porque significa un riesgo adicional asociado al cambio global. Mantener los servicios ecosistémicos de soporte y regulación proporcionados por los microorganismos del suelo en el tiempo se hace cada vez más necesario, por lo que hay que evaluar los controles (drivers) que moldean estas comunidades y el efecto que los disturbios antrópicos pueden ejercer sobre las mismas.

En el ensamble de comunidades microbianas de suelo, los factores abióticos son de gran importancia, puesto que se ha observado que estos organismos exhiben mucha sensibilidad a la temperatura, la humedad, la concentración de nutrientes, el pH del suelo, etc. (Daily et al. 1997, Wardle 2006, Nemergut et al. 2013). Sin embargo, no está bien definida la importancia de los factores bióticos, aunque sí se ha hecho mucho énfasis en las relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos (Douglas 2010). Las comunidades microbianas de suelo tienen características distintivas que las hacen únicas en cuanto a estructura y funcionamiento (Cuadro 1.1). La complejidad de las interacciones en las comunidades microbianas del suelo y su alta sensibilidad hacen que su respuesta a los disturbios sea difícil de predecir y muy contexto-dependiente. Pero también son esas mismas características las que permiten que estas comunidades brinden múltiples servicios ecosistémicos (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Características ecológicas de las comunidades de microorganismos del suelo.

Características	Comunidad de microorganismos del suelo	Referencias
Niveles tróficos	Toda una red trófica	(Buchkowski et al. 2017)
Diversidad	700-1000sp/0.25gr de suelo (sólo bacteria)	(Nannipieri et al. 2003)
Tasas de reproducción	1 generación/30min (máximo en condiciones óptimas de laboratorio) Existe transmisión horizontal de genes muy frecuentemente	(Nemergut et al. 2013)
Mecanismos de escape	Dormancia, muy frecuente	(Jones and Lennon 2010)

Movilidad	Dispersión a pequeña escala por motilidad, mayor por transporte por fauna del suelo o agua o efecto humano.	(Nemergut et al. 2011)
Interacciones entre especies de la comunidad	Fuerte competencia por interferencia (sustancias antimicrobianas) y por diferentes estrategias de uso de nutrientes, diferencias en la eficiencia de ocupación de nichos, etc. Facilitación y “Quorum sensing” Depredación y parasitismo (al ser una red trófica).	(Buchkowski et al. 2017) (Vos et al. 2013)
Rango de distribución	Muy amplio, pueden desarrollarse en ambientes extremos y colonizan todos los ambientes.	(Bodelier 2011)
Servicios ecosistémicos que soportan	Sostenimiento de los cultivos y las praderas a través de la fertilidad del suelo, purificación del aire a través del secuestro de carbono en el suelo, promotores del crecimiento vegetal (PGPR), etc.	(Bodelier 2011)

Un disturbio en el suelo podría alterar la composición de las comunidades microbianas por su alta sensibilidad, si bien la magnitud y naturaleza del disturbio es un factor determinante. Para saber si el impacto de un determinado disturbio se traducirá en un cambio en su funcionamiento ecosistémico deberíamos poder asociar la identidad de las especies a funciones específicas. Existen estudios que sugieren que hay una relación directa y positiva entre la diversidad de microorganismos y la cantidad de funciones ecosistémicas en el suelo (Fierer et al. 2013), lo que contradice la idea de redundancia y justifica la conservación de la diversidad microbiana. Sin embargo, otros estudios revelan la existencia de comunidades microbianas del suelo de diferente estructura pero similar funcionamiento (Bissett et al. 2011), apoyando la teoría de la redundancia funcional. Estas incongruencias podrían explicarse por un marco conceptual distinto que contempla la complejidad de la vida y los procesos del suelo: los procesos relacionados con el ciclo de carbono estarían modulados por comunidades de microorganismos diversas, redundantes y abundantes, pero en el caso de las funciones más específicas como la fijación de nitrógeno, los responsables serían grupos específicos y poco abundantes de

microorganismos del suelo (Schimel et al. 1998). Bajo estos preceptos, uno podría suponer que los servicios ecosistémicos más generales, tales como purificación del aire y el agua y secuestro de carbono, por ejemplo, se podrían conservar, aun cuando un disturbio provoque una disminución abrupta de la biodiversidad de los microorganismos en el suelo, mientras que la producción de alimentos y forrajes podría verse disminuida por la reducción de la fijación biológica de N en los suelos, que es llevada a cabo por microorganismos más específicos.

Actualmente, estudiar la composición de las comunidades microbianas no permite saber sobre su funcionamiento porque todavía no hay una articulación entre la composición de microorganismos del suelo, que ahora ha sido mejor descrita, y su función. Se puede describir la composición de microorganismos presentes en el suelo con técnicas moleculares, y también cuantificar la expresión de los genes que están activos en el suelo al estudiar el ARN, pero no se puede decir qué funciones está cumpliendo cada grupo de microorganismos en el suelo. Los recientes estudios de secuenciación de ADN y ARN total del suelo de forma simultánea son prometedores para poder aproximarse al interrogante de la conexión entre identidad y función de los microorganismos del suelo (Carvalhais et al. 2012). De todos modos, esta conexión es muchas veces contexto-dependiente por la gran versatilidad metabólica de los microorganismos, por lo que los patrones globales o regionales que se han encontrado son escasos y están relacionados a fuertes gradientes abióticos como el pH (Fierer and Jackson 2006), la temperatura y la humedad del suelo (Nemergut et al. 2010, Rascovan et al. 2013). Por otra parte, Fierer y colaboradores (2007) generaron una clasificación de las bacterias del suelo a partir de su capacidad para desarrollarse en ambientes con mayor o menor disponibilidad de C: los organismos copiótrofos (asimilable a los r-estrategas) y los oligótrofos (K-estrategas), respectivamente. Por ejemplo, encontraron que los grupos de Bacteroidetes y β -Protobacterias son copiótrofos, mientras que Acidobacteria es un grupo oligótrofo. Esta clasificación, si bien es a una escala taxonómica muy general, es muy útil para entender la estructura y funcionamiento del suelo, aunque nuevamente implica un rango amplio de disponibilidad de C para poder evidenciar diferencias entre grupos microbianos. En el análisis de la escala regional, la diversidad estructural microbiana y la diversidad de

plantas se han propuesto como predictores de la diversidad funcional de las comunidades microbianas de suelo, pero no se han encontrado respuestas consistentes a lo largo de todos los ecosistemas (Strickland et al. 2009, Fierer et al. 2013, Prober et al. 2015). De ello se desprende la necesidad de realizar análisis locales-regionales para generar marcos conceptuales propios de esa escala y entender cómo los cambios en el uso de la tierra alteran las comunidades microbianas de suelo y los procesos biogeoquímicos que ellas median.

1.1.4. Contribución de los microorganismos al ciclado de nutrientes en el suelo

En cuanto a los procesos que los microorganismos del suelo llevan a cabo, hay varias formas de estudiarlos y conocer la participación de los distintos grupos en los procesos fisicoquímicos del suelo. Entre las medidas clásicas de actividad microbiana están el contenido de carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana y la respiración de suelo, medida en condiciones óptimas de temperatura y humedad en incubadoras (respiración potencial) o a campo (Joergensen and Emmerling 2006). Estas variables permiten saber el nivel general de actividad de los microorganismos del suelo y aportan valiosa información cuando se interpretan a luz de otras variables, como el carbono orgánico, el nitrógeno total en el suelo o la biomasa de raíces. La fertilización, por ejemplo, podría inducir un pico de respiración en los primeros momentos después de la aplicación del fertilizante siempre que haya humedad en el suelo y el carbono no sea limitante para la actividad bacteriana.

Es importante aclarar que actualmente contamos con un nuevo marco conceptual que enfatiza el rol de los microorganismos del suelo en la formación y estabilización de carbono orgánico en el suelo. Cotrufo y colaboradores (2013) desarrollaron la idea de que la mayor proporción del C estable en el suelo es producto del carbono lábil que ingresa en el suelo a través de las plantas, que luego es transformado en productos microbianos y finalmente se asocia a la porción mineral del suelo. Esta idea es contraria al viejo concepto de que el carbono no podía ser metabolizado por los microorganismos debido a su composición (“recalcitrancia”) y por lo tanto aportaba mayor cantidad de materia

orgánica al suelo. Se proponía que el C de baja calidad (antes llamado recalcitrante) podía estabilizarse más eficientemente que el C de alta calidad (lábil). En el nuevo modelo conceptual MEMS (Microbial Efficiency-Matrix Stabilization), se propone agregar el concepto de saturación de C por el cual se definen dos tipos de reservorios de C estable en el suelo (Castellano et al. 2015): 1) C de producto microbiano estabilizado por partículas minerales y 2) C orgánico derivado de las plantas y poco estable. Como la fracción que puede estabilizarse por partículas minerales puede saturarse, cuando se satura el C orgánico derivado de las plantas se acumula en forma no estable. Los factores climáticos y de manejo determinan el grado de saturación del C orgánico en el suelo y la acumulación de C no estabilizado.

Por otra parte, el ciclado del nitrógeno en el suelo está mediado por los microorganismos y este proceso es fundamental para la producción agrícola y ganadera. Los cambios en el uso de la tierra y el aumento del N de los suelos, que son dos aspectos del cambio global, pueden alterar el funcionamiento de las comunidades microbianas de suelo, amenazando la provisión de servicios ecosistémicos. Una consecuencia conocida de la fertilización con N es la disminución de la fijación biológica de N en los suelos, ya sea simbiótica o de vida libre (Reed et al. 2011, Tognetti et al. 2021). En pastizales pastoreados naturalmente hay poca abundancia de leguminosas que son capaces de establecer una simbiosis con bacterias fijadoras de N. En este sentido cobra relevancia la fijación biológica de N por microorganismos de vida libre como flujo de entrada de N en pastizales bajo uso ganadero, aunque se trate de una proporción pequeña de la fijación biológica en general (Reed et al. 2011). La fijación de N por microorganismos de vida libre, según la bibliografía, tiene un promedio aproximado de $4.7 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en un rango de $0.1\text{-}21 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mientras que la fijación simbiótica ronda entre 1 y $10 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ para pastizales templados (Reed et al. 2011), si hay leguminosas. Si el flujo de entrada de N por fijación biológica es alterado por efecto antrópico, puede haber una reducción en la producción de forraje para el ganado.

Otra alteración importante del ciclo del N que podría darse por efecto antrópico es el aumento en la emisión de óxido nitroso, potente gas de efecto invernadero, que da cuenta de la actividad de los microorganismos nitrificadores y desnitrificadores. La

emisión de este gas produce destrucción de la capa de ozono en la estratosfera y aumento del efecto invernadero, razón por la cual su monitoreo y reducción es prioritaria dentro del séptimo Objetivo del Desarrollo del Milenio de la Naciones Unidas (Millennium Ecosystem Assessment and MA 2005). La emisión de óxido nitroso es una ineficiencia del proceso de desnitrificación, que genera N_2 gaseoso a partir de nitrato, y del proceso de nitrificación. La fertilización nitrogenada puede aumentar la emisión de dicho gas en pastizales (Mosier et al. 1991), mientras que el pastoreo no tiene un efecto consistente en todos los ecosistemas (Frank et al. 2000, Le Roux et al. 2003, Wolf et al. 2010).

En el suelo también hay otros importantes macronutrientes de los que no se hizo mención aún, el potasio (K) y el fósforo (P). En el suelo hay microorganismos capaces de solubilizar el potasio presente en ciertos minerales del suelo (Setiawati and Mutmainnah 2016). Este nutriente no suele ser limitante para el crecimiento de las plantas en la mayoría de los suelos, excepto por excesiva extracción por cultivo, lixiviación o erosión (Navarro Blaya and Navarro García 2003). De hecho, en un trabajo reciente que describe el efecto de los nutrientes en una red de experimentos coordinados en pastizales, se muestra que el agregado de P no aumento la productividad del pastizal, pero hubo una respuesta al agregado simultáneo de varios nutrientes incluyendo el K, poniendo en evidencia la co-limitación al crecimiento de las plantas por múltiples nutrientes (Fay et al. 2015). La solubilización y mineralización de P también es mediada por microorganismos, como ser algunos hongos micorrícicos y *Pseudomonas spp* (Richardson and Simpson 2011), lo que permite que dicho nutriente esté disponible para las plantas. A su vez, el P es un importante nutriente para los microorganismos en sí por lo que parte queda de éste queda retenida en la biomasa microbiana. La importancia del P para las cianobacterias es clave porque requieren altos niveles de energía (ATP) para el proceso de fijación de N_2 , por lo que se ha visto que el P limita el crecimiento de este grupo bacteriano (Reed et al. 2008).

1.1.5. Cambios esperados en los microorganismos del suelo y el ciclado de nutrientes con el agregado de nutrientes y el pastoreo

Consecuencias del agregado de nutrientes

En un escenario hipotético de aumento de nutrientes en el suelo (Stevens et al. 2015), como componente del cambio global, puede afectar a la comunidad de microorganismos del suelo de modo directo e indirecto. La composición y el funcionamiento de las comunidades microbianas pueden verse directamente alterados ante el aumento de nutrientes limitantes como el nitrógeno (N) y fósforo (P) en el suelo (Treseder 2008, Ramirez et al. 2010, 2012). Por ejemplo, los suelos de baja fertilidad favorecen el canal de energía a través de los hongos (mayoritariamente K-estrategas), lo cual cambia diametralmente con el agregado de nutrientes, favoreciendo la canalización de energía a través de las bacterias (mayoritariamente R-estrategas) (Parfitt et al. 2010). En efecto, se ha encontrado una marcada disminución de las micorrizas ante el agregado de N en el suelo (Treseder 2004), alteración que es aún más marcada si se agrega P (Johnson et al. 2003). La mayor disponibilidad de N y P en el suelo favorece que las plantas tomen dichos nutrientes del suelo, en vez de promover la simbiosis con los hongos micorrícicos. La menor micorrización podría tener repercusión sobre la estructura del suelo, por la ausencia de las glicoproteínas que éstas exudan y que ayudan a la agregación del suelo y la estabilidad de la materia orgánica (Wilson et al. 2009). A su vez, puede que a corto plazo el agregado de nutrientes sea inmovilizado por los microorganismos, que son más hábiles que las plantas para captarlos, aumentando su actividad y su biomasa microbiana (Chu et al. 2007). Sin embargo, los grupos funcionales de microorganismos son muy amplios y las variaciones a nivel de familia o especie de bacterias u hongos puede dar una mejor idea de cómo se altera la composición de microorganismos del suelo frente al agregado de nutrientes a una escala local.

Asimismo, las comunidades del suelo pueden verse afectadas indirectamente con el agregado de N a través del cambio en la comunidad de plantas (Suding et al. 2005, Bobbink et al. 2010, Prober et al. 2015), mediado por cambios en la cantidad y calidad del material vegetal muerto (broza) que ingresa al suelo (Xia and Wan 2008). En general, el agregado de N aumenta la productividad primaria neta aérea de los pastizales (Fay et al. 2015), con lo cual habría una mayor tasa de ingreso de broza al suelo, y también aumenta la exudación radical (Bardgett et al. 1999), con lo cual podría aumentar la rizósfera y la actividad microbiana en la misma (Bardgett et al. 1999). A largo plazo, el

continuo agregado de N puede provocar un colchón de broza no descompuesta que puede limitar la germinación de ciertas especies vegetales (Fowler 1988). La presencia de plantas exóticas también puede modular la comunidad microbiana del suelo en composición y actividad al modificar el suelo y sus procesos (Wolfe and Klironomos 2005). Ello puede ocurrir a través de múltiples vías no excluyentes como ser: una entrada diferente de nutrientes que son aportados al suelo por la broza de las especies exóticas, ciertos exudados radicales, alteraciones en la estructura física del suelo por cambios en la arquitectura radical, y otros procesos especificados (Wolfe and Klironomos 2005, Yahdjian et al. 2017). Por ejemplo, en pastizales post agrícolas de la Pampa Interior invadidos por *Festuca alta* (*Schedonorus arundinaceus*, ex *Festuca arundinacea*) se observó que las comunidades bacterianas eran diferentes de los relictos de pastizal nativo, mientras que los pastizales invadidos con una comunidad vegetal poco diversa sostenían comunidades del suelo muy diversas (López Zieher et al. 2020). Los mecanismos por los cuales no ocurrió la homogeneización de la comunidad microbiana en los pastizales invadidos no fueron puestos a prueba, pero puede especularse a partir de la teoría ecológica que altas disponibilidades de nutrientes en el suelo beneficiaron la diversificación de la comunidad microbiana del suelo. La falta de relación positiva entre la diversidad local de plantas y la de bacterias fue consistente con lo encontrado cuando se analizó una red de experimentos global que incluye varios pastizales del mundo, la Nutrient Network (Prober et al. 2015). Esto podría implicar que el rol de las plantas como controladoras de la composición de las comunidades microbianas no parece ser fuerte a escala global ni local en suelo no-rizosférico. Es necesario entonces seguir estudiando en profundidad los efectos de los cambios a escala global en las comunidades microbianas en correlación con las comunidades de plantas, como se realizó en esta tesis, para poder comprender los determinantes de la biodiversidad de los suelos que es la garantía de los servicios ecosistémicos que brinda el sistema.

Otro ejemplo de cambios de las comunidades de suelo ante cambios en la vegetación es la menor relación leguminosas/gramíneas que se observa ante el agregado de N (Xia and Wan 2008), que conlleva a una disminución de la comunidad de simbioses fijadores de N en el suelo. El P y la combinación NP, por el contrario, favorece a las leguminosas,

y, por ende a los microorganismos simbioses asociados a estas plantas (Houlton et al. 2008). Por otra parte, como consecuencia de la mayor calidad de la broza (menor relación C:N) y disponibilidad de N al agregar dicho nutriente al suelo, los microorganismos degradaran más rápidamente la materia orgánica, lo cual podría conducir a una disminución del C secuestrado en el suelo, fenómeno conocido como “priming” (Manning et al. 2008, Zhu et al. 2021, Abdalla et al. 2022). Sin embargo, este concepto está muy discutido y un meta-análisis reciente muestra poca evidencia a favor de la existencia del priming de C por agregado de fertilizantes (Feng and Zhu 2021). El carbono estabilizado en el suelo es un reservorio relativamente estable en cuanto a su tamaño porque se encuentran equilibradas las salidas y entradas de dicho compartimiento. Sin embargo, ante un aumento de la disponibilidad de N, los microorganismos del suelo podrían aumentar su consumo de carbono produciendo su reducción en el suelo, mientras que aumentaría la biomasa microbiana. De todos modos, el foco de esta tesis está en el N. Determinar cómo se alteran los reservorios de materia orgánica en el suelo y los cambios en el N de la biomasa microbiana por los flujos biológicos de inmovilización y mineralización de N ayudará a entender el ciclado del nitrógeno del sistema y cómo se ve alterado por el agregado de nutrientes debido a la fertilización o los aumentos en las deposiciones atmosféricas.

Consecuencias del pastoreo

La introducción de animales domésticos ha producido importantes cambios en las comunidades vegetales (Sala et al. 1986b, Milchunas et al. 1988, Campana 2021) y en las microbianas (Patra et al. 2005). El pastoreo por bovinos puede afectar en forma directa a la comunidad de microorganismos del suelo al producir excreciones que aceleran el retorno de los nutrientes al suelo respecto al ciclo natural del pastizal no pastoreado (Bardgett et al. 1997, Lindsay et al. 2010) y al provocar la muerte de raíces y mayor exudación radical por el consumo de las plantas (Dyer et al. 1982; Lemaire et al. 2000). Por otra parte, el pisoteo y la excreta por parte de los animales generan más heterogeneidad en el ambiente edáfico propiciando espacios anaeróbicos y/o enriquecidos en nutrientes que pueden favorecer a distintos grupos de microorganismos. Incluso podría

ocurrir que los microorganismos de las heces de los animales se incorporen directamente en la comunidad del suelo, por ejemplo los microorganismos desnitrificadores (Maeda et al. 2010).

A su vez, puede existir un efecto indirecto del pastoreo sobre el funcionamiento y la composición de microorganismos al cambiar la composición de plantas (Chaneton et al., 2002; Sala et al., 1986). Por ejemplo, el pastoreo perjudica a las leguminosas, que son más consumidas que las gramíneas por su mayor palatabilidad (Rutter 2006), lo cual disminuye las comunidades simbióticas fijadoras de N asociadas a las leguminosas como fue explicado más arriba. Por otra parte, el pastoreo intenso también ejerce una fuerte presión de selección sobre la estructura de la comunidad vegetal, siendo las plantas rastreras las beneficiadas al poder escapar mejor al pastoreo. Esto implica que hay un fuerte cambio en la diversidad de plantas que puede implicar cambios en la calidad o cantidad de nutrientes que entran al suelo o en la estructura o exudados radicales, si bien, como ya se mencionó, no parece haber una relación directa entre la diversidad alfa de plantas y la de microorganismos (Prober et al. 2015). Esta relación depende de la identidad de las especies de plantas que integran el pastizal estudiado y del manejo del ganado, razón por la cual se deben estudiar con profundidad estos aspectos para determinar en qué medida se está afectando el funcionamiento de los microorganismos del suelo cuando cambia la composición de la comunidad vegetal.

El efecto del pastoreo sobre la composición y el funcionamiento de los microorganismos del suelo podría compensar parcialmente o exacerbar el efecto del agregado de nutrientes al suelo dependiendo del proceso estudiado. Por ejemplo, el efecto negativo del agregado de N sobre la fijación de N por microorganismos de vida libre podría ser compensada en parte por el efecto positivo que el ganado tiene sobre dicho proceso al aumentar el ciclado del P (Chaneton et al. 1996), ya que el P es fuente de energía (ATP) para el proceso de fijación biológica de N (Reed et al. 2011). Asimismo, se ha mostrado que la fertilización junto con el pastoreo tienen una relación antagónica sobre la productividad primaria, ya que la mayor productividad primaria neta (PPN) provocada por la fertilización es contrarrestada parcialmente por un aumento en el consumo vegetal por parte de los herbívoros en respuesta al aumento en la cantidad o

calidad del alimento (Campana and Yahdjian 2021). Este aumento del consumo del ganado del pastizal fertilizado produce que la cantidad de broza que ingresa al suelo sea similar al de un pastizal que no fue fertilizado ni pastoreado. Es muy poco lo que se sabe hasta el momento del efecto del pastoreo sobre las comunidades de microorganismos del suelo y su impacto en los procesos que mantienen la producción de forraje en campos ganaderos. Por otra parte, el efecto conjunto que tendrían la ganadería y la fertilización en pastizales naturales en un contexto de cambio de uso de la tierra y aumento de las deposiciones de nutrientes en los suelos es fundamental para generar nuevas estrategias de manejo tendientes a preservar los servicios ecosistémicos del pastizal (Borer et al. 2014).

1.1.6. Evaluación de la multifuncionalidad de los ecosistemas

La multifuncionalidad de los ecosistemas (MF) se ha convertido en un concepto muy popular en los últimos años con el objetivo de ser una herramienta de manejo capaz de conectar múltiples procesos ecosistémicos con opciones de manejo y promover la sustentabilidad de los sistemas productivos (Byrnes et al. 2014). Este abordaje holístico sería fundamental para evaluar el impacto del cambio global sobre los pastizales de la Pampa Deprimida. Sin embargo, en la práctica, la “multifuncionalidad” ha demostrado ser un término vagamente definido y su teoría y aplicación han resultado a veces en la unión de análisis y patrones estadísticos dispares sin mucho anclaje en los servicios ecosistémicos. Por ejemplo, no existen definiciones fuertes o marcos teóricos para la parte “multi” del término multifuncionalidad (¿cuántas funciones ecosistémicas deben ser consideradas?), ni tampoco para la parte de “funcionalidad” (¿qué funciones deber ser consideradas?). Por otra parte, para que los índices se conviertan efectivamente en herramientas de manejo deben reflejar servicios ecosistémicos (también conocidos como beneficios de la naturaleza a las personas, Díaz et al. 2015), pero estos son muy difíciles de medir. En esta tesis se propone que los servicios ecosistémicos de soporte pueden servir como intermediarios entre las funciones ecosistémicas y los servicios finales para mejorar los índices de multifuncionalidad. En particular se consideran 4 servicios de

soporte igualmente importantes: calidad de suelo, ciclado del agua, producción de plantas y biodiversidad. En esta tesis se propone que los índices de multifuncionalidad podrían considerar conjuntos de funciones y atributos ecosistémicos de tal manera de estar mucho más conectados con los beneficios que las personas obtienen de la naturaleza, y ser directamente interpretables y usados como herramientas de manejo para cualquier ecosistema. Este nuevo índice se usará en esta tesis aplicado al caso de los pastizales pampeanos aquí estudiados.

1.2. Objetivos generales

El objetivo de esta tesis fue estudiar el impacto que producen las actividades humanas a través del aumento de nitrógeno, fósforo y potasio en el suelo y el pastoreo bovino en la composición y funcionamiento de las comunidades microbianas del suelo, usando como modelo un pastizal de la Pampa Deprimida. Estos pastizales pertenecen a la gran planicie de los pastizales del Río de La Plata y son de gran importancia económica para la población argentina por la cría extensiva de ganado vacuno. El uso continuo de estos pastizales ha llevado a disminuciones en su biodiversidad (Chaneton et al. 2002), determinando una degradación del sistema natural sobre el cual se sustenta esta importante actividad productiva. Determinar la magnitud y la dirección del cambio de las comunidades microbianas del suelo en composición y función frente al aumento de nutrientes en el suelo y al pastoreo aportará el conocimiento necesario para minimizar el deterioro de estos ecosistemas y asegurar la provisión de los servicios ecosistémicos.

Por otra parte, el estudio holístico de las comunidades microbianas de suelo en pastizales ganaderos en Sudamérica y de los flujos de Nitrógeno (N) y Carbono (C) asociados propuesto en esta tesis es de vital importancia para la región para contar con un diagnóstico de la situación actual y poder evaluar el impacto que tendrá el cambio global a futuro. En particular en la Pampa Deprimida, estudios previos mostraron que los principales procesos de ciclado de N son la fijación de N atmosférico por microorganismos de vida libre presentes en el suelo, la mineralización de N y la emisión de N_2O por microorganismos nitrificadores y desnitrificadores (Chaneton et al. 1996). La comparación de estos procesos en condiciones naturales con la que ocurre en parcelas

fertilizadas nos permite anticiparnos a un escenario de mayor deposición de nutrientes por fertilización (Stevens et al. 2015). También, el cambio en el uso de la tierra que puede implicar aumentos en la carga de animales en respuesta a la intensificación ganadera se combinará con los cambios en los nutrientes produciendo efectos interactivos difíciles de predecir. El sitio experimental en la Pampa Deprimida integra una red internacional de experimentos coordinados llamada “The Nutrient Network, NutNet” (http://www.nutnet.org/field_sites), que incluye más de 100 sitios de pastizales en todos los continentes, establecida con el objetivo de evaluar la respuesta de los pastizales dominados por herbáceas frente al aumento de nutrientes y los cambios en los consumidores (Borer et al. 2014). De esta forma, los resultados obtenidos de este trabajo pueden ser comparados con los de otros sitios experimentales del mundo, aportando valiosa información para el entendimiento del impacto del cambio global en los pastizales del mundo. Además, por ser un sitio experimental que forma parte de una red que usó un protocolo estandarizado de muestreo, se contó con la información del efecto de la fertilización y el pastoreo en la comunidad de plantas y en la productividad primaria neta en las parcelas estudiadas (Campana and Yahdjian 2021, Campana et al. 2022), lo que permitió interpretar los resultados sobre la composición y funcionamiento de comunidad microbiana de suelo a la luz de la información de la comunidad de plantas.

1.3. Sitio de estudio

Para evaluar el efecto de la adición de múltiples nutrientes y remoción de pastoreo doméstico en las comunidades del suelo y los procesos biogeoquímicos asociados, se realizó un experimento factorial en la Estancia ganadera “Las Chilcas”, de 3000 has de extensión, ubicada a aproximadamente 40 km al sur de Pila, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Fig. 1.2; 36° 16’ S, 58° 15’ W; 15 msnm). El sitio es representativo de la comunidad mesofítica húmeda de la parte central de la Pampa Deprimida. La productividad primaria neta aérea promedio es 550 g m⁻² año⁻¹, con un pico en primavera tardía. El suelo es Natraquol Típico ligeramente ácido y poco profundo (80 cm hasta el horizonte C) y un horizonte B2t de baja permeabilidad (Lavado y Taboada, 1987). La topografía es muy plana y el drenaje escaso, lo cual provoca inundaciones periódicas en

invierno y primavera. En el verano suelen ocurrir sequías de corta duración que salinizan el suelo. El contenido de materia orgánica es de 7.12%, el de nitrógeno es de 0.38% y el de fósforo de 22 ppm. Estos suelos no son aptos para la agricultura por las inundaciones y el contenido de sales, pero permiten el desarrollo de la actividad ganadera extensiva.

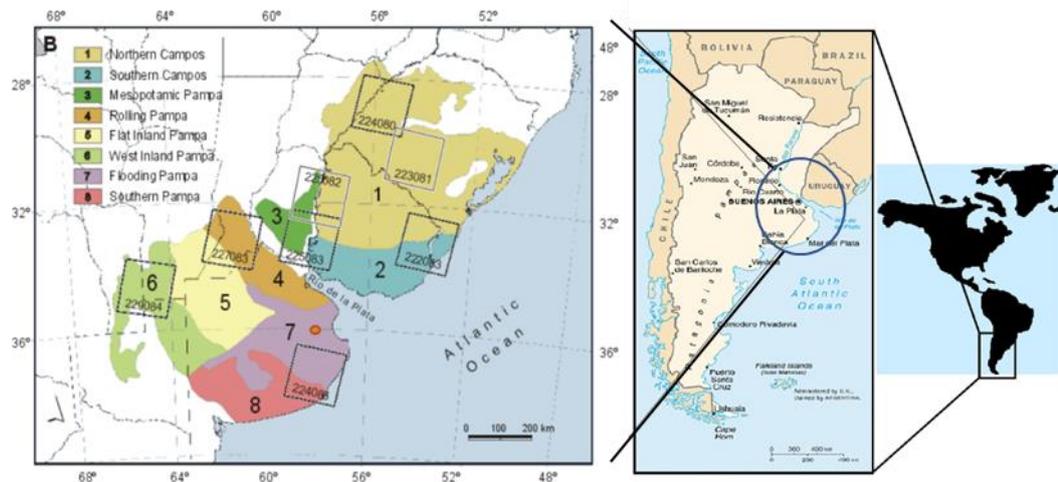


Figura 1.2. Ubicación del sitio de estudio dentro de la región de los pastizales del Río de La Plata. El punto naranja representa el sitio experimental en la Pampa Deprimida

En 2013 se analizaron las variables edáficas a partir de muestras de los primeros 10 cm de suelo, y se determinó la materia orgánica total, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), el pH, el contenido de fósforo, el contenido de iones (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , etc.) y el contenido de nitrógeno (N) y carbono (C) total con un analizador elemental de C y N (Cuadro 1.1). Las propiedades del suelo que se describen a continuación se midieron según los protocolos de la red de nutrientes NutNet (https://nutnet.org/sites/default/files/2019-10/Soil%20sample%20methods_4Oct2019.pdf). Brevemente: los macronutrientes (excepto C y N totales), micronutrientes, CIC, ph del suelo y materia orgánica fueron analizados en Waypoint Analytical (Memphis, TN, USA). El ph fue medido con un phmetro en una solución agua:suelo 1:1. La determinación del contenido de fósforo, potasio, calcio, magnesio, sulfuro, boro, cobre, hierro, manganeso, zinc y sodio fue realizada mediante el método Mehlich-3. Los contenidos de cationes medidos fueron los

intercambiables. La materia orgánica se estimó mediante el método de pérdida por ignición determinado luego de 2 horas a 400°C. Para la medición de C y N totales se realizó en el laboratorio de Borer/Seabloom en la Universidad de Minesotta usando cromatografía de gases de combustión seca en un analizador elemental (Costech ECS 4010 CHNSO Analyzer, Valencia, California, USA) calibrado con el estándar analítico, atropina (C₁₇H₂₃NO₃). No conocemos el contenido de carbonato del suelo del sitio de estudio por lo que agregamos una aclaración en los métodos y la discusión al respecto.

Cuadro 1.2. Análisis químico del suelo del sitio de estudio “Las Chilcas”. Partido de Pila, Pcia. De Bs As. Los valores son promedio de 6 muestras de suelo de los primeros 10 cm antes del comienzo del experimento. CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

Variable de suelo	Valor medio	Error estándar
Materia orgánica (%)	7.12	0.18
CIC (meq/100g)	16	0.28
pH	6.39	0.03
Fósforo disponible (Bray, ppm)	22	0.53
Potasio (ppm)	497	10.71
Calcio (ppm)	1522	26.92
Magnesio (ppm)	585	12.98
Azufre (ppm)	24	0.92
Sodio (ppm)	256	5.18
Zinc (ppm)	6	0.52
Manganeso (ppm)	42	1.71
Hierro (ppm)	335	14.66
Cobre (ppm)	3	0.10
Boro (ppm)	3	0.10
C total (%)	4.03	0.07
N total (%)	0.38	0.01

1.4. Diseño experimental

El diseño del experimento consistió en un factorial completo de fertilización y pastoreo del que surgieron cuatro tratamientos (Fig. 1.3), repetidos en un total de 6 bloques. Cada bloque contenía una clausura con 2 parcelas de 5 x 5 m con los tratamientos agregado de nitrógeno, fósforo y potasio (NPK+) y sin agregado de nutrientes (control), y fuera del área clausurada, dos parcelas del mismo tamaño y tratamientos pastoreadas regularmente (1 vaca/ha, valor representativo de la zona) en primavera y verano. Una de estas parcelas en pastoreo recibió también el tratamiento de agregado de nutrientes NPK+ y la otra se dejó sin fertilizar. La tasa de aplicación de nutrientes en las parcelas fertilizadas fue seleccionada para garantizar su disponibilidad para las plantas: $10 \text{ g m}^{-2} \text{ año}^{-1}$ (que equivale a $100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) de cada macronutriente (N, P y K). La aplicación del fertilizante fue dividida en 3 fechas al año: mayo, septiembre y diciembre. La fuente de N es urea, la de P es superfosfato triple, y la de K es sulfato de potasio. También se aplicaron micronutrientes durante el primer año del experimento a razón de 100 g m^{-2} con la composición de Micromax (Ca 6%, Mg 3%, S 12%, B 0.1%, Cu 1%, Fe 17%, Mn 2.5%, Mo 0.05% y Zn 1%). Para más detalles de los fertilizantes consultar la página de NutNet: <https://nutnet.org/index.php/nutrients>. Las dosis aplicadas sirven a dos fines 1) poder comparar los resultados en nuestro sitio experimental con los otros pastizales de la red del mundo que participan de la red NutNet y que aplicaron las mismas dosis de fertilizante (siguieron el protocolo estandarizado), 2) generar un escenario de saturación de nutrientes para observar la respuesta del crecimiento de las plantas y el suelo y así evaluar las co-limitaciones por nutrientes. En las clausuras se aplicó un corte mecánico y remoción de biomasa tres veces al año (mayo, septiembre y diciembre) para reducir la dominancia de la especie exótica, *Schedonorus arundinaceus* (ex *Festuca arundinacea*), y que tenga así una diversidad de plantas más similar a la situación original previo a la invasión. Utilizando datos de concentración de nutrientes en la biomasa verde y la biomasa cosechada durante los cortes mecánicos en el mes de diciembre, se estimó que en esa fecha se cosecharon aproximadamente 3.82 g m^{-2} de N y 0.6 g m^{-2} de P. No se tienen valores de nutrientes en plantas para las otras fechas de remoción de biomasa, mayo y septiembre, pero, con el valor informado, inferimos que la cantidad de P extraída por

los cortes es considerablemente menor a la dosis de $10\text{g de P m}^{-2}\text{ año}^{-1}$ utilizado como fertilizante, mientras que el valor de N extraído está dentro del mismo orden de magnitud. En forma análoga, el ganado remueve parte de la biomasa del pastizal y en el caso de las parcelas fertilizadas, estaría removiendo parte de los nutrientes agregados. Por lo tanto, consideramos que las comparaciones realizadas siguen siendo válidas, ya que con el fertilizante aumentamos los nutrientes disponibles tanto en pastoreo como dentro de la clausura.

Las clausuras al ganado doméstico se establecieron en 2004, mientras que la fertilización se comenzó en 2013 y se continuó todos los años siguiendo el mismo protocolo. Esta tesis analizó los resultados hasta abril de 2017.

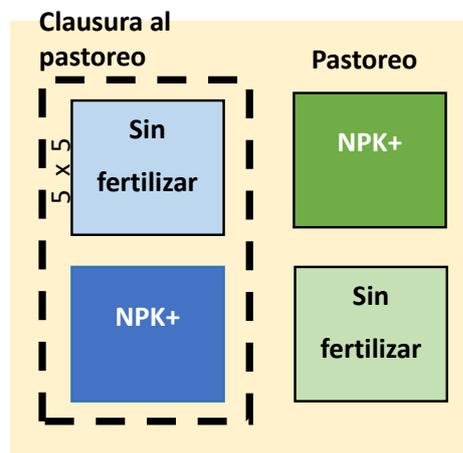


Figura 1.3: Diseño experimental del proyecto. Los principales factores son el pastoreo y los nutrientes, de lo que se desprenden los tratamientos sin agregado de nutrientes y con agregado de nutrientes (NPK+) en pastoreo y clausura al pastoreo respectivamente, en un diseño de parcelas divididas replicado en 6 bloques completos. La línea punteada representa el alambrado.

El muestreo de suelo a partir del cual se midieron todos los procesos se realizó durante dos años consecutivos en primavera y verano, los momentos de máxima cobertura de las especies vegetales, cuando se espera mayor actividad radical y microbiana (Prashar et al. 2014). Los procesos de suelo que requerían de mediciones consecutivas se evaluaron con una frecuencia mensual durante la estación de crecimiento de las plantas (noviembre-

marzo). El detalle metodológico de las variables de repuesta se encuentra en los capítulos correspondientes donde se muestran los resultados.

1.5. Objetivos particulares y organización general de la tesis

La presente tesis está estructurada en 5 capítulos. El capítulo corriente, **Capítulo 1**, es una introducción general, presenta el sitio de estudio y el diseño del experimento en el que se realizó el estudio. Los siguientes tres capítulos contienen los principales resultados, organizados de acuerdo con los tres objetivos específicos que se detallan a continuación.

En el **Capítulo 2** se aborda el objetivo específico “Evaluar los efectos de la fertilización con nutrientes (NPK), el pastoreo y su interacción sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo.” Se realiza una descripción de los cambios en la comunidad microbiana de suelo en tanto estructura y composición como respuesta al agregado de nutrientes y el pastoreo. Para ello se utilizaron herramientas de biología molecular que permitieron secuenciar el ADN de hongos y bacterias de suelo y herramientas bioinformáticas para el análisis de los datos.

En el **Capítulo 3** se desarrolla el objetivo específico de “Evaluar el efecto de la fertilización con nutrientes (NPK), el pastoreo y su interacción sobre los principales procesos de ciclado de carbono y nitrógeno mediados por los microorganismos del suelo.” Para ello se estimaron los principales procesos de ciclado de nitrógeno mediados por los microorganismos del suelo, la fijación biológica y la emisión de óxido nitroso, y algunos componentes del ciclo del carbono, para evaluar sus cambios como respuesta al agregado de nutrientes y al pastoreo en los pastizales de la Pampa Deprimida.

En el **Capítulo 4** se desarrolla el objetivo específico “Estudiar la multifuncionalidad del pastizal y su cambio debido a la fertilización con NPK y el pastoreo” y en él se muestra la respuesta de los pastizales a estos dos factores relacionados con las actividades humanas con un enfoque multifuncional, para lo cual se desarrolló un nuevo índice de multifuncionalidad capaz de representar el sistema holísticamente y servir para fines prácticos de manejo de ecosistemas.

Finalmente, en el **Capítulo 5**, se destacan los aportes novedosos de los resultados encontrados a lo largo de la tesis en el contexto del marco teórico utilizado. Se realiza un modelo actualizado del ciclo de N completo y de sus cambios cuando se pastorean o fertilizan los pastizales de la Pampa Deprimida. Los procesos y reservorios del ciclo se obtienen a partir de los datos recabados en capítulos anteriores, y se completa con información bibliográfica en los casos necesarios. Además, en este capítulo se discuten las implicancias de los resultados para la conservación y el manejo de pastizales ganaderos y se enumeran las perspectivas futuras que se derivan de esta tesis.

CAPÍTULO 2. Comunidades microbianas del suelo en pastizales fertilizados y pastoreados

2.1 Introducción

Los pastizales albergan la mayor diversidad de microorganismos del suelo en el planeta (Walters and Martiny 2020, Bastida et al. 2021). Los pastizales suelen sustentar una comunidad microbiana abundante, diversa y activa en el suelo como resultado de los aportes de carbono que hacen las plantas al suelo, tanto en la parte aérea como el aporte de raíces y exudados. Al igual que otros ecosistemas, en los pastizales las comunidades vegetales que se desarrollan por encima y por debajo del suelo están íntimamente conectadas con las comunidades microbianas del suelo a través de numerosas interacciones que son importantes para el funcionamiento del ecosistema (Sala and Austin 2000). Al mismo tiempo, los pastizales son los ecosistemas más impactados por las actividades humanas dado que en las regiones templadas donde se desarrollan se concentran las actividades agrícolas y ganaderas del mundo. La quema de combustibles fósiles, la fertilización agrícola y la producción de polvo o cenizas asociados con las actividades humanas han aumentado considerablemente los aportes de nitrógeno, fósforo y otros elementos a los ecosistemas en comparación con los niveles preindustriales (Galloway et al. 2004, Wang et al. 2015). Por otra parte, el pastoreo de ganado doméstico para la producción de carne, leche y cuero, y el transporte, la producción de estiércol para combustible y la aplicación de fertilizantes causan cambios en las comunidades de plantas y animales y en muchos casos la degradación del suelo (Sala et al. 2017).

Los cambios ambientales provocados por las actividades humanas están alterando la distribución de las especies y las interacciones interespecíficas (Parmesan 2006). Para estudiar las consecuencias de las actividades humanas se han realizado experimentos de campo que simulan experimentalmente distintos cambios globales (Flombaum et al. 2017). Estos experimentos evalúan, en su mayoría, los efectos de un solo factor de cambio a la vez, y se miden sus consecuencias sobre las comunidades de plantas y animales (Komatsu et al. 2019) y en menor medida sobre las comunidades de microorganismos (López Zieher et al. 2020). Son menos los estudios que evalúan los efectos simultáneos de varios factores de cambio, e incluso muy pocos los que consideran al pastoreo en combinación con otros agentes de cambio global (Komatsu et al. 2019). Conocer los

efectos de la interacción entre el aumento de la disponibilidad de nutrientes y la presencia de ganado, estudiando pastizales pastoreados y no pastoreados en las comunidades microbianas y su relación con los cambios en las comunidades de plantas permitirá entender mejor las consecuencias del cambio global sobre la diversidad y el funcionamiento de los pastizales.

La red de investigación colaborativa internacional “The Nutrient Network” (<https://nutnet.org/>) con más de 100 sitios en el mundo, entre ellos en pastizales de la región pampeana, representa una aproximación sin precedentes al estudio de los nutrientes y los herbívoros en las condiciones de cambio global actuales (Borer et al. 2014). El experimento de nutrientes instalado en los pastizales de la Pampa Deprimida tiene una característica única respecto a otros sitios de la red NutNet que es la combinación de tratamientos de fertilización con pastoreo por ganado doméstico, típico de la región pampeana (Fig. 1.2, capítulo 1). Durante los primeros 5 años del experimento se encontró que la combinación de adición de nutrientes y exclusión del ganado doméstico produjeron efectos sinérgicos en las comunidades de plantas y su funcionamiento. Tal como es esperable, se encontró que el pastoreo redujo la biomasa aérea de las plantas y aumentó el porcentaje de luz a nivel del suelo (Campana 2021). En cambio la fertilización incrementó la productividad primaria neta aérea (PPNA), sólo bajo pastoreo, pero como la presión de pastoreo también aumentó en respuesta al fertilizante, el ganado consumió el exceso de biomasa vegetal producido. En consecuencia, se redujo la biomasa vegetal aérea incluso más que en la condición sin fertilizar (Campana 2021). Esta intensificación del consumo del ganado podría haber estado mediada por la mayor calidad nutricional de la biomasa vegetal ya que la adición de nutrientes aumentó la concentración de N y P en los tejidos de las plantas y promovió la abundancia de especies leguminosas en el pastizal pastoreado (Ciavattini 2017). Contrariamente a lo esperado, la presencia del ganado promovió la abundancia de leguminosas cuando el pastizal fue fertilizado (Ciavattini 2017). Sin embargo, todavía se desconoce qué relación tienen estos cambios en de la comunidad de plantas con la respuesta de las comunidades microbianas del suelo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la fertilización y el pastoreo sobre las comunidades de bacterias y hongos del suelo y su relación con los cambios en las comunidades de plantas luego de 13 años de exclusión de ganado y 4 años de fertilización en los pastizales estudiados. Las hipótesis que se pusieron a prueba fueron:

Hipótesis 1) La fertilización y el pastoreo alteran las comunidades de microorganismos del suelo porque modifican el ambiente biótico y abiótico que son determinantes del ensamble de las comunidades.

Hipótesis 2) La fertilización disminuye la diversidad de la comunidad microbiana porque favorece a un grupo reducido de microorganismos capaces de proliferar en el suelo con mayor disponibilidad de nutrientes.

Hipótesis 3) el pastoreo aumenta la diversidad microbiana dado que genera un ambiente heterogéneo por el pisoteo, la excreta de orina y heces, favoreciendo a distintas especies microbianas en distintos micrositios y dando como resultado mayor heterogeneidad.

Hipótesis 4) los cambios que producen la fertilización y el pastoreo sobre las comunidades microbianas están relacionados con los cambios en la comunidad vegetal, dada la estrecha relación que existe entre plantas y microorganismos del suelo.

Las comunidades microbianas de suelo se estudiaron a través de métodos de secuenciación masiva como se describe en la sección siguiente. Estudiando el ADN de las bacterias y los hongos de suelo podemos conocer la composición y estructura de dichas comunidades. Primeramente, lo que se analizó fue la profundidad de la secuenciación a través de la rarefacción. Esta metodología consiste en un re-muestreo de las secuencias encontradas para ver cuántas “especies” se van encuentran tomando X cantidad de secuencias. Esto se hace aumentando la cantidad de secuencias y se obtiene una curva de rarefacción. Lo ideal es estar en el plateau de la curva, donde al muestrear más secuencias ya no se encuentran más especies lo que significa que la profundidad del muestreo fue óptima. Luego, como no todas las muestras extraen la misma cantidad de secuencias, las mismas son rarificadas a una cantidad de secuencias en común para evitar la sub o sobre estimación por causa de un tamaño variable de muestra. La comparación

entre muestras sólo es posible si el tamaño de las muestras es homogéneo. De esta manera ya podemos analizar la diversidad alfa, que es la diversidad local, y responder a las preguntas clásicas de cuántas “especies” de bacterias y hongos hay en términos de Riqueza (R), y cuál es la equitatividad o dominancia de la comunidad a través de distintos índices de diversidad. El índice de Shannon (H) es una forma de medir la uniformidad de la comunidad, es decir, cuán similares son las abundancias de las distintas especies dentro de una comunidad. Mientras mayor sea el índice de Shannon, mayor la uniformidad, mientras que si el valor es elevado reflejara una comunidad muy dominada. El índice de Simpson (S) por su parte es una medida de la dominancia de la comunidad. Finalmente, otro índice complementario es el de Pielou (J), que da idea de la equitatividad de una comunidad y es un índice que varía entre 0 y 1, siendo 1 cuando todas las especies son igualmente abundantes. A continuación, es conveniente estudiar la diversidad beta, que permite evaluar la estructura de las comunidades contemplando la similitud o distancia entre ellas a través de matrices que contemplan la composición, abundancia y/o distancias filogenéticas. En este sentido, podemos obtener distinta información según la matriz de distancia o similitud elegida. Bray Curtis es una medida de la diferencia composicional entre 2 comunidades que tiene en cuenta la diferencia entre la abundancia de las especies comunes de 2 muestras. El valor está limitado entre 0 y 1, siendo 0 cuando la especie sólo se encuentra en una de las dos muestras, y 1 cuando la especie es igualmente abundante en las 2 muestras consideradas. Otra distancia muy informativa es Unweighted Unifrac, que tiene en cuenta la distancia genética entre las especies de la comunidad, y es Weighted Unifrac cuando además considera la abundancia de las especies.

2.2. Metodología

La descripción del sitio de estudio y el diseño experimental figuran en el capítulo 1 de esta tesis. Para analizar los resultados de esta tesis, se cuenta con la información de la comunidad vegetal de las mismas parcelas experimentales para evaluar la relación entre la respuesta de las plantas y de los microorganismos a la fertilización y al pastoreo gracias a que otros integrantes del grupo de investigación estudiaron la composición y la

abundancia relativa de las especies de plantas en este mismo experimento (Tesis doctoral de Sofía Campana (2020) y trabajos publicados citados en el lugar correspondiente).

2.2.2. Muestras de suelo y extracción de ADN

En abril de 2017, se colectaron 72 submuestras de suelo, conformando 24 muestras compuestas de 3 submuestras cada una al azar dentro de cada parcela, de los primeros 10 cm de profundidad, con un barreno de suelo. El muestreo se hizo evitando las áreas que tuvieran bosta de vaca y descartando la broza depositada sobre el suelo. Las muestras se utilizaron para determinar tasa de respiración, humedad, ADN y biomasa microbiana y variables químicas que se detallan en el Capítulo 3. Las submuestras de suelo de cada parcela se homogeneizaron rápidamente en el campo, dentro de una bolsa ziploc, y luego una fracción se introdujo con una cuchara esterilizada en un tubo eppendorf que fue colocado inmediatamente en un termo con nitrógeno líquido. Para realizar la extracción de suelo en las distintas parcelas, se limpiaron los barrenos y demás implementos que hubieran estado en contacto con la muestra, y las manos de los operarios con alcohol al 70% para evitar la contaminación de las muestras. En el laboratorio, las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento para extraer el ADN total del suelo con el kit Zymo Quick-DNA Fecal/Soil Microbe. El procedimiento de extracción implica los siguientes pasos: 1) las muestras de suelo (≤ 5 g) se agregan directamente a un ZR BashingBead™ Lysis/Filtration Tube, donde los microorganismos son lisados, 2) el ADN se aísla y se purifica con la tecnología Zymo-Spin™, y 3) el resultante es filtrado para eliminar los ácidos húmicos/polifenoles que inhiben la PCR.

2.2.3. Secuenciación y análisis de las comunidades microbianas

Las comunidades microbianas se caracterizaron usando el gen 16S para bacterias (16S v3-v4, secuencia: CCTACGGGNGGCWGCAG) y la región ITS para hongos (ITS 3F-4F, secuencia: GCATCGATGAAGAACGCAGC). La compañía MacroGen preparó las librerías y realizó la secuenciación mediante Illumina HiSeq 1500 con la técnica

paired-end con un tamaño de secuencia de 150 pares de bases (Macrogen, Corea). Las operaciones con las secuencias que se detallan a continuación se realizaron con el software Qiime 2 (<https://qiime2.org/>) (Bolyen et al. 2019). Se utilizó el método DADA2 para fusionar los *reads paired-end*, filtrar secuencias y eliminar ruido de secuenciación, eliminar quimeras y generar *features*, que son secuencias representativas no-redundantes equivalentes a “especies”. Para la identificación taxonómica de los *features* se usaron las bases de datos de referencia SILVA versión 138 (<https://www.arb-silva.de/>) para bacterias y UNITE (<https://plutof.ut.ee/#/doi/10.15156/BIO/786385>) para hongos. En ambos casos la asignación se realizó con clasificadores del tipo Naive Bayes, también usando la implementación existente en Qiime 2.

2.2.4. Análisis de diversidad y estadísticos

Se realizaron los análisis correspondientes a la diversidad alfa y beta tanto de hongos como de bacterias con diferentes métodos implementados en QIIME2. Primeramente, se realizó la rarefacción de los datos para constatar la profundidad relevada dentro de las comunidades de bacterias y hongos. A continuación, se calcularon distintos índices a la escala local (Riqueza, Shannon, Simpson y Pielou) para estimar la riqueza, la diversidad y la equitatividad alfa de las comunidades microbianas. Se analizó la composición de microorganismos a distintos niveles taxonómicos (*feature*, especie, género y familia). Finalmente, se estudió la diversidad beta mediante el cálculo de matrices de distancia Weighted Unifrac, Unweighted Unifrac y Bray Curtis seguido por la visualización de los resultados mediante análisis de coordenadas principales sobre los datos rarificados a una misma profundidad. Además, se utilizó el análisis Adonis para validar los agrupamientos por niveles de los factores experimentales. A continuación, se analizó la correlación entre comunidades microbianas y de plantas mediante el test Mantel (según la implementación en el paquete *vegan* de R) para comparar los controles de las distintas comunidades bióticas del sistema. El Mantel test es un análisis multivariado que permite estimar la significancia de un conjunto de variables como explicativas de una matriz. (Smouse et al. 1986). Además, mediante el script Bioenv (paquete *vegan* de R) se estudió la correlación entre las comunidades de hongos, bacteria y plantas con los factores ambientales que

serán presentados en detalle en el Capítulo 3 (óxido nitroso emitido, temperatura del aire y suelo, pH y humedad gravimétrica del suelo, porcentaje de poros llenos de agua, contenido de amonio y nitrato en el suelo, proporción de leguminosas, radiación fotosintéticamente activa, cobertura total, cobertura verde, NDVI, productividad primaria neta aérea, biomasa total de plantas, nitrógeno y carbono en la biomasa microbiana, relación C:N del suelo y respiración de suelo).

2.3. Resultados

A partir de las 24 muestras de suelo, se obtuvieron 4064214 y 6198252 secuencias de bacterias y hongos respectivamente. Luego del filtrado de calidad y la creación de la fusión de las secuencias *paired-end*, el número de secuencias se redujo al 23.6 y 57.1% para bacterias y hongos, respectivamente. Las secuencias fusionadas tenían un largo promedio de 437 bases que variaba entre 262 y 460 nucleótidos para bacterias y un largo promedio de 377 bases que variaba entre 274 y 496 nucleótidos para hongos.

Las secuencias de bacterias se agruparon en 13662 *features* que fueron asignados taxonómicamente a 412 géneros correspondientes a 292 familias y a 30 filos (Fig. 2.1). Los filos bacterianos más abundantes fueron Proteobacteria, Acidobacteria, Actinomycetes y Firmicutes.

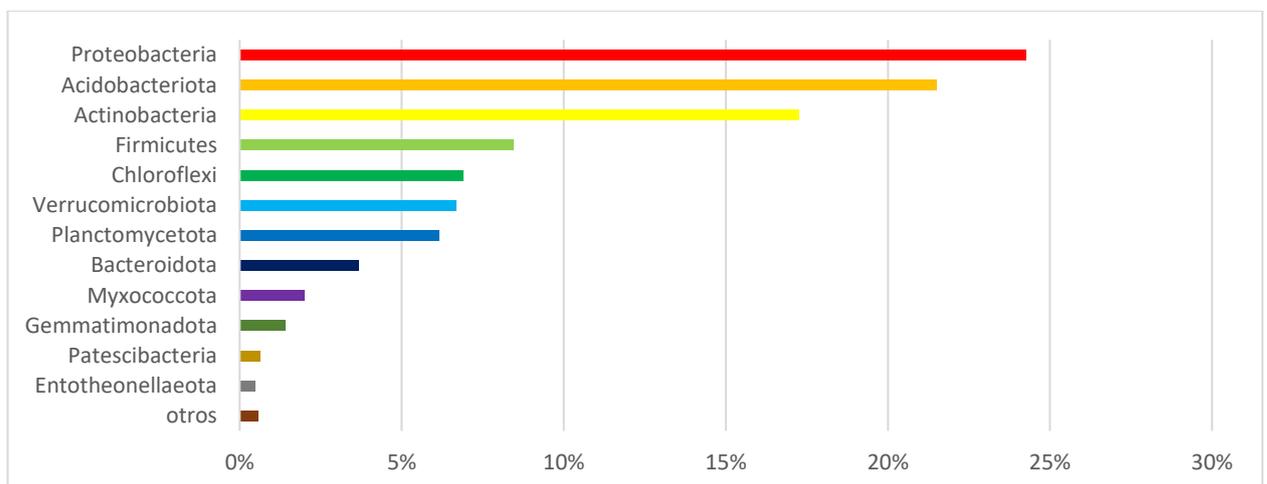


Figura 2.1. Abundancia relativa de la cantidad de secuencias encontradas correspondientes a los distintos filos bacterianos.

Las secuencias de hongos se agruparon en 8852 *features* de hongos que fueron asignados taxonómicamente a 385 géneros correspondientes a 14 filos (Fig. 2.2). Los filos fúngicos más abundantes fueron Ascomycota, el dominante, y en segundo término Basidiomycota.

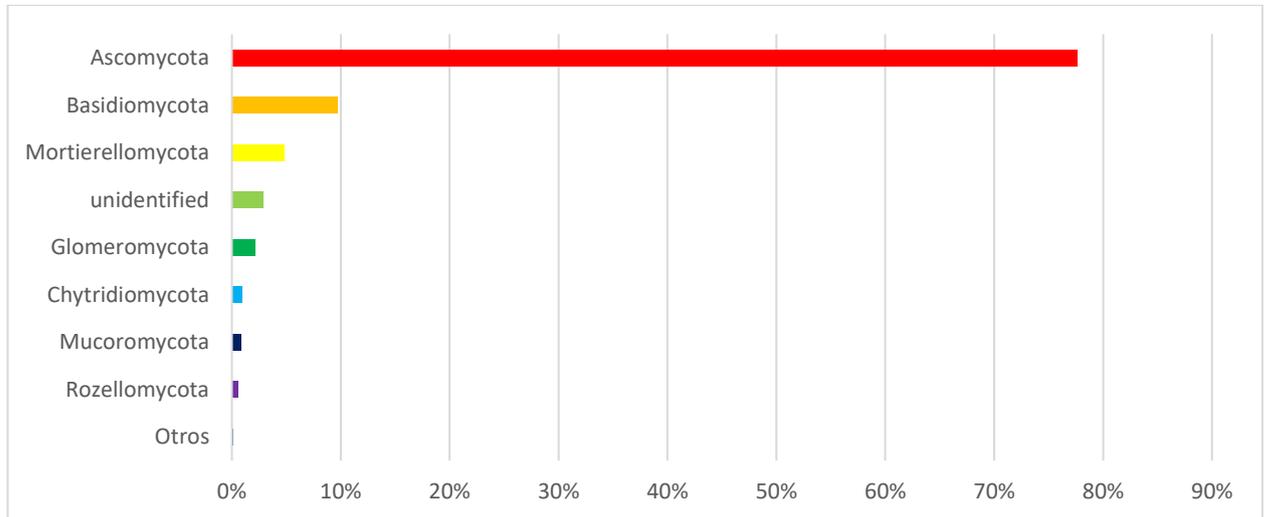


Figura 2.2. Abundancia relativa de la cantidad de secuencias encontradas correspondientes a los distintos filos fúngicos.

2.3.1. Comunidades de bacterias en suelos fertilizados y pastoreados

La composición de las comunidades de bacterias analizadas con coordenadas principales fue significativamente distinta entre los tratamientos de fertilización ($p=0.017$), pero no cambió por la presencia del ganado doméstico (Figura 2.3). Un grupo reducido de especies (5.5% del total de especies de bacterias) pero muy abundante (41% de la abundancia total de bacterias del suelo) fue común a todos los tratamientos (Figura 2.4a). En cambio, la gran mayoría de las especies (77.2% del total de especies de bacterias) fueron exclusivas de alguno de los cuatro tratamientos resultantes de la combinación de fertilización y pastoreo y representaron el 26% de la abundancia total de bacterias presentes en el suelo (Figura 2.4a).

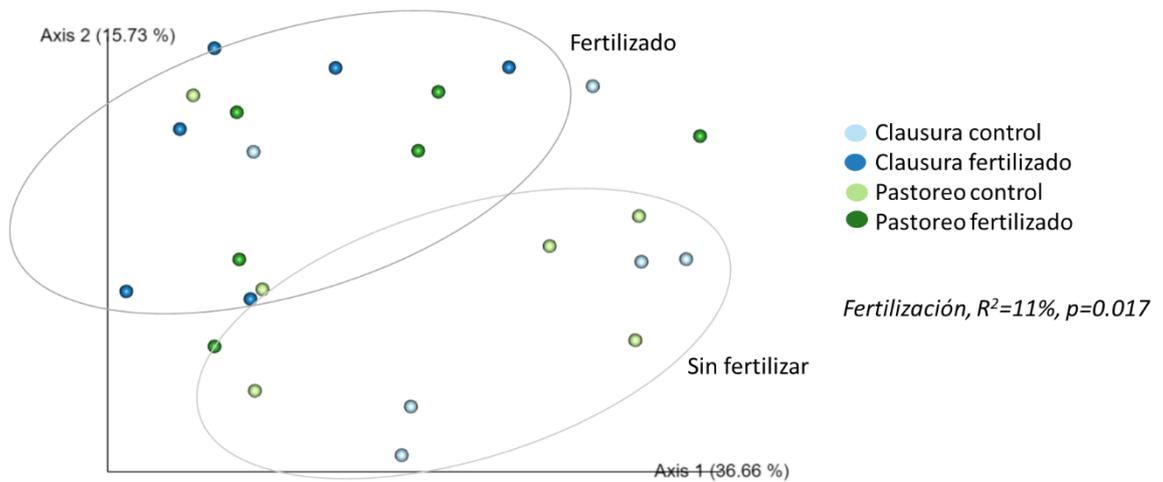


Figura 2.3. Análisis de coordenadas principales basadas en las distancias de Weighted Unifrac para la comunidad de bacterias de suelo.

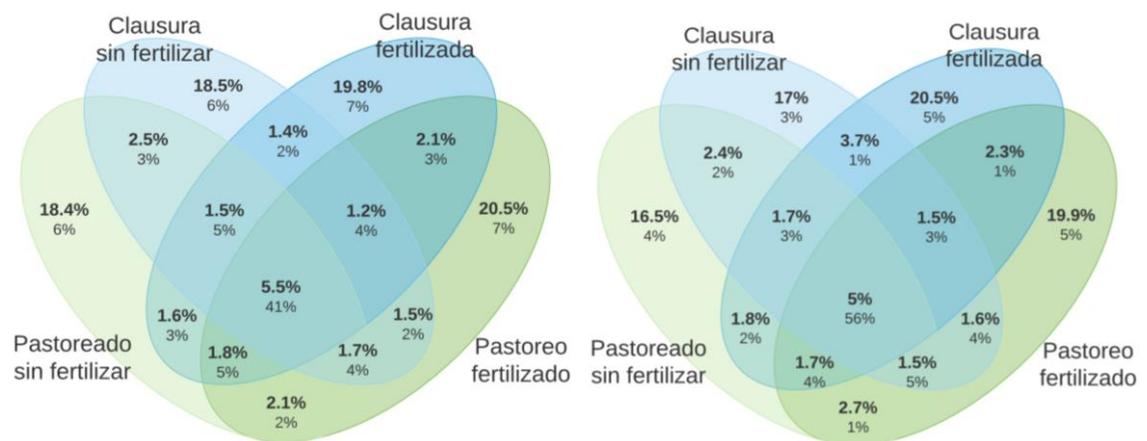


Figura 2.4. Diagramas de Venn para especies de a) bacterias y b) hongos. El primer valor indicado en cada área del diagrama corresponde al porcentaje de la cantidad de especies, mientras que el de abajo representa el porcentaje de las secuencias.

La fertilización generó cambios en la abundancia relativa de algunas familias y géneros. Cuatro familias de bacterias que representaron un 15% de la abundancia total (Figura 2.5) disminuyeron su abundancia debido a la fertilización, con reducciones de hasta el 42% en el caso de la familia Gemmataceae. En particular, los géneros *Sutterella* (familia Sutterellaceae) y *Solibacter* (familia Solibacteraceae) fueron los que mostraron mayor reducción de abundancia (Cuadro A1). A su vez, otras 3 familias aumentaron su abundancia en los pastizales fertilizados, con aumentos de hasta el 60% en el caso de una

familia de Firmicutes. Estos cambios en la abundancia fueron independientes del pastoreo (interacción fertilización x pastoreo no significativa, Cuadro 2.1).

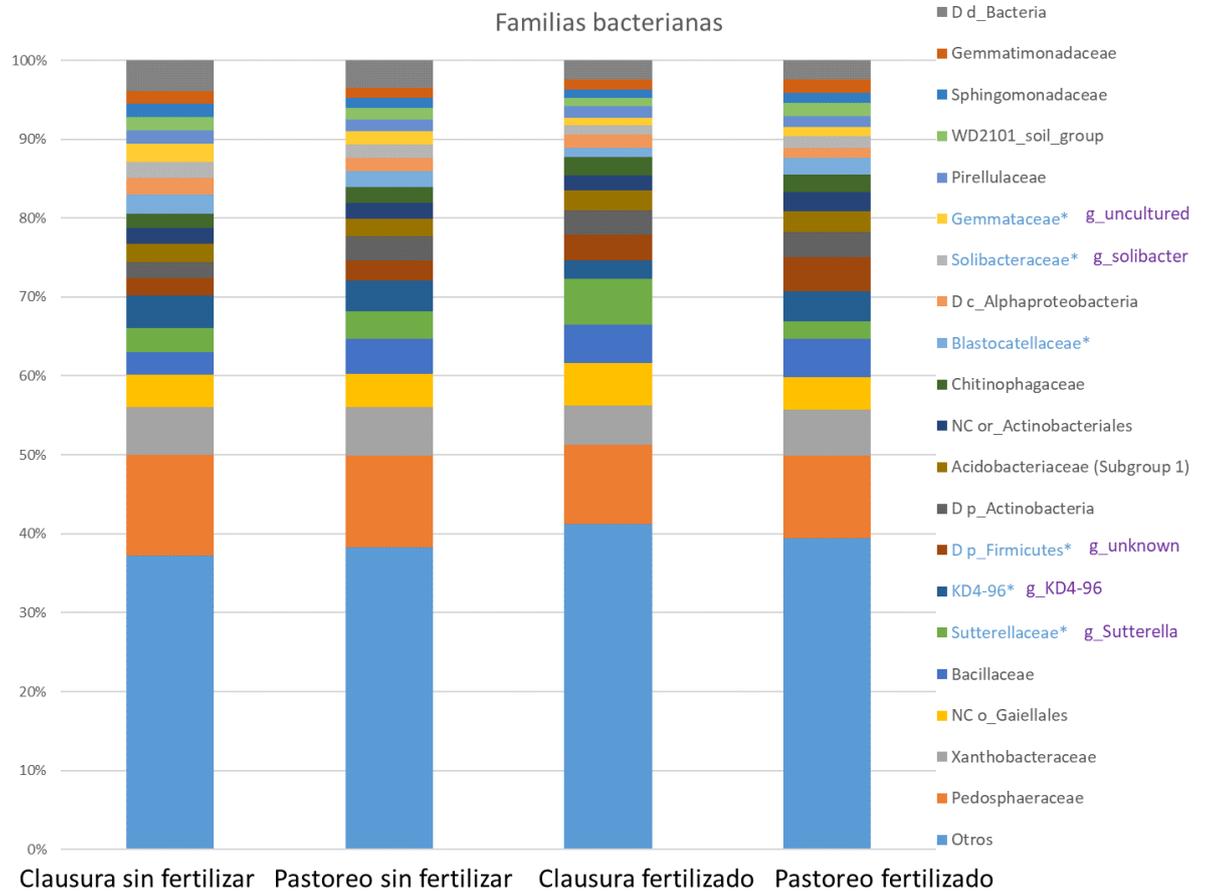


Figura 2.5. Abundancia relativa de las familias bacterianas presentes en cada tratamiento. Se menciona en la leyenda el nombre de la familia encontrada y en el caso de que el grupo fuera desconocido o sin nombre asignado, se utilizó el nombre del nivel taxonómico más cercano. En la leyenda se muestran en color azul los nombres de las familias que mostraron diferencias significativas entre tratamientos fertilizado y sin fertilizar. También se aclaró en violeta el género (“g”) al cual corresponde el organismo que originó esas diferencias significativas, ya que se trató de familias que tenían un único género representante.

Cuadro 2.1. Abundancia relativa de las 6 familias bacterianas que mostraron cambios significativos por tratamiento. Se muestra también el valor de p (significancia) para el tratamiento de fertilización y el porcentaje de cambio producto de la fertilización con NPK.

Familia	Abundancia relativa			
	Sin fertilizar	Fertilizado		

	Clau	Past	Clau	Past	Significancia para fertilización	Porcentaje de cambio por fertilización
Sutterellaceae	3%	4%	6%	2%	0.0453	26%
KD4-96	4%	4%	2%	4%	0.002	-22%
p_Firmicutes	2%	3%	3%	4%	0.005	61%
Blastocatellaceae	2%	2%	1%	2%	0.0392	-24%
Solibacteraceae	2%	2%	1%	1%	0.0487	-24%
Gemmataceae	2%	2%	1%	1%	<0.0001	-42%

A diferencia de la composición de especies que al ser analizadas con coordenadas principales no habían mostrado una diferencia significativa por el pastoreo pero mostraron cambios por la fertilización (Fig. 2.3), la diversidad de bacterias resultó afectada por el pastoreo y no por la fertilización. La equitatividad de bacterias, calculada mediante el índice de Pielou, fue significativamente mayor en pastoreo (0.958 vs 0.952, Kruskal Wallis $H=11.21$, $p=0.0008$), pero otros aspectos de la diversidad, como ser la riqueza y la diversidad estimada a través del índice de Shannon fueron similares entre tratamientos de fertilización y pastoreo (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Índices de diversidad (Riqueza, Shannon y Pielou) para la comunidad de bacterias de suelo del pastizal estudiado para los distintos tratamientos. Se presenta el valor promedio, el error estándar ($n=6$) y el valor asociado del análisis estadístico de Kruskal Wallis.

índice	Sin fertilizar				Fertilizado			Parámetros Kruskal Wallis		
	Clausura		Pastoreo		Clausura		Pastoreo	H	p	
Riqueza	987.17	±79.31	1057.67	±68.89	1005.17	±109.88	1069.5	±77.9	0.9	0.83
Shannon	9.47	±0.1	9.6	±0.09	9.44	±0.16	9.63	±0.11	2.32	0.51
Pielou	0.95	±0.0013	0.96	±0.0011	0.95	±0.0024	0.96	±0.001	12.44	0.01

2.3.2. Comunidades de hongos en suelos fertilizados y pastoreados

La composición de las comunidades de hongos analizadas con coordenadas principales fue significativamente ($p=0.004$) distinta entre los tratamientos de fertilización y marginalmente diferente ($p=0.054$) en respuesta al pastoreo, (Figura 2.6). Similar a lo observado para bacterias, un grupo reducido de especies (5% del total de

especies de hongos) pero muy abundante (56% de la abundancia total de hongos del suelo) fue común a todos los tratamientos (Figura 2.4b). La mayoría de las especies (73.9% de las especies de hongos) fueron exclusivas de alguno de los cuatro tratamientos resultantes de la combinación de fertilización y pastoreo, y poco abundantes (17% de la abundancia total de hongos presentes en el suelo) (Figura 2.4b).

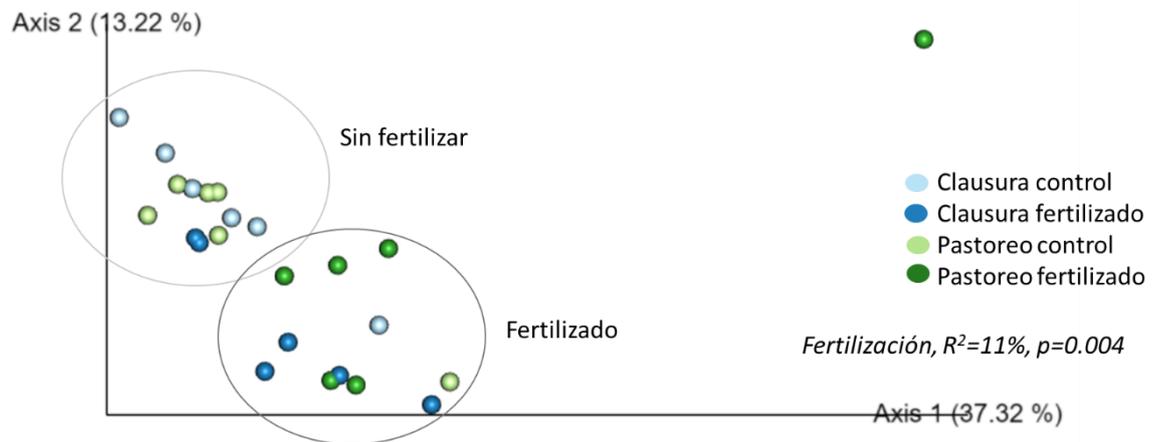


Figura 2.6. Análisis de coordenadas principales basadas en las distancias de Weighted Unifrac para la comunidad de hongos de suelo.

La fertilización y el pastoreo generaron cambios en la abundancia relativa en nueve géneros de los 20 más abundantes (50% de las secuencias totales, Figura 2.7). Los géneros *Helotiales* e *Hypocreales* mostraron aumentos significativos con la fertilización. En cambio, el género *Leohumicola*, perteneciente al orden Venturiales y a la familia Eurotiomycetes, disminuyeron con la fertilización. Por otro lado, dos géneros de hongos aumentaron significativamente su abundancia en pastoreo (uno desconocido de la familia Coniochaetaceae y otro desconocido de la familia Chaetomiaceae) y otros dos géneros disminuyeron por pastoreo (*Fusarium* y un género desconocido del orden Chaetothyriales, Figura 2.7).

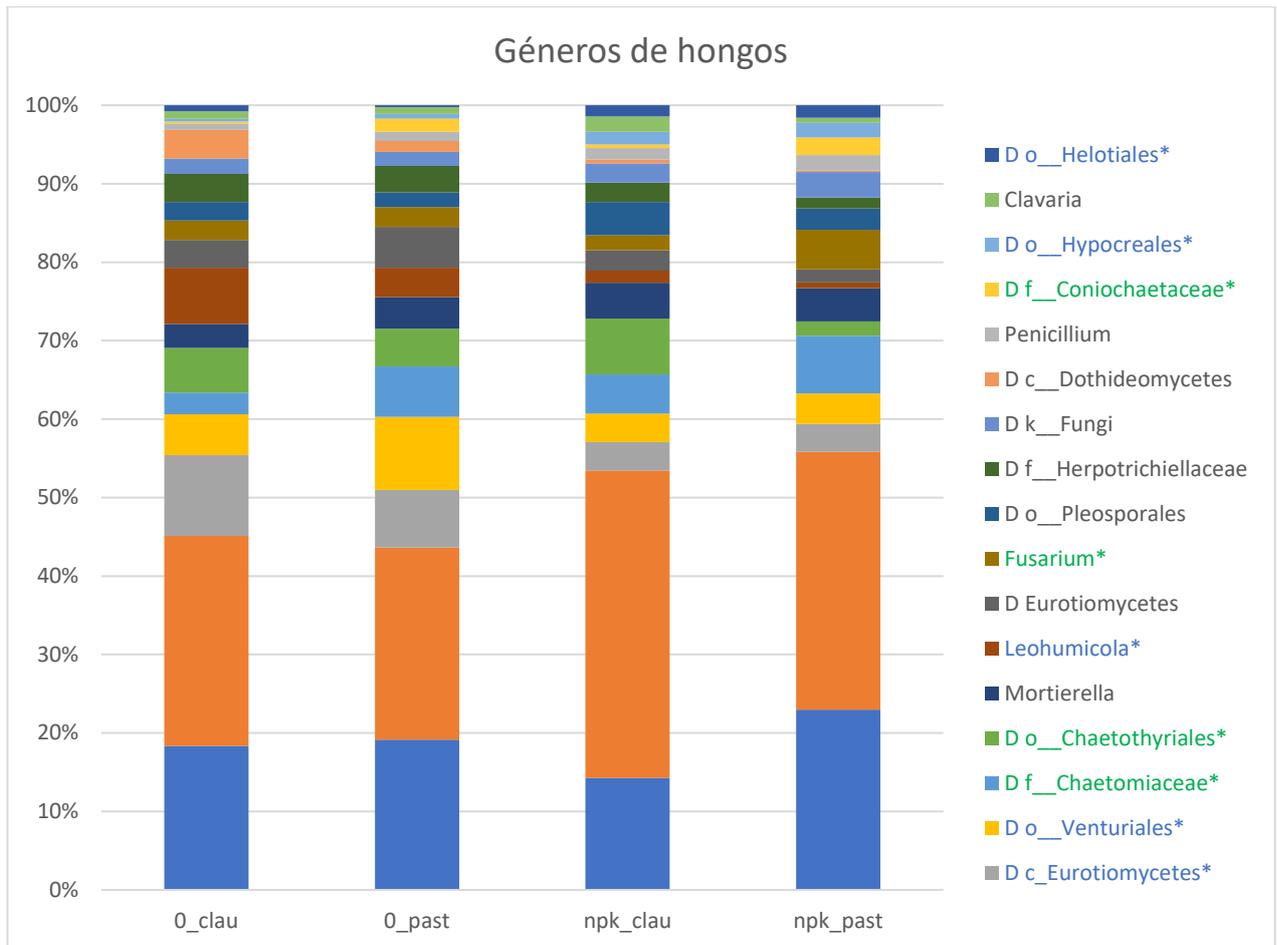


Figura 2.7. Abundancia relativa de los géneros fúngicos presentes en cada tratamiento. Se menciona en la leyenda el nombre del género encontrado o en caso de que fuera desconocido o no asignado el nombre, se utilizó el nombre del nivel taxonómico más cerca que sí tuviera nombre. En la leyenda se colorearon en azul los nombres de las familias que mostraron diferencias significativas entre tratamientos de fertilización, y en verde los que mostraron diferencias entre tratamientos pastoreo y clausura.

La riqueza de hongos fue levemente mayor con exclusión de pastoreo y fertilización, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 2.3). La diversidad de hongos estimada con los índices de Shannon y Pielou también fue similar entre los pastizales pastoreados y sin vacas y en las dos condiciones, con agregado de nutrientes y sin fertilizar (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Índices de diversidad (Riqueza, Shannon y Pielou) para la comunidad de hongos del pastizal estudiado para los distintos tratamientos. Se presenta el valor

promedio y el error estándar (n=6) y en la última columna el valor asociado del análisis estadístico de Kruskal Wallis.

índice	Sin fertilizar				Fertilizado				Parámetros Kruskal Wallis	
	Clausura		Pastoreo		Clausura		Pastoreo		H	p
Riqueza	721.5	±51.91	676.67	±76.01	806.33	±70.94	728.17	±44.13	1.25	0.74
Shannon	7.42	±0.29	7.51	±0.23	7.74	±0.18	7.5	±0.12	1.35	0.72
Pielou	0.78	±0.02	0.8	±0.01	0.8	±0.01	0.79	±0.01	0.39	0.94

2.3.3. Relación de los efectos de la fertilización y el pastoreo sobre comunidades de plantas y microorganismos

Las comunidades de plantas y microorganismos respondieron distinto a la fertilización y al pastoreo. La composición de las comunidades de plantas fue significativamente distinta entre los tratamientos de pastoreo (Figura 2.8 a), pero no mostró relación significativa con las comunidades de bacterias y hongos del suelo (Figura 2.8 b y c, correlación entre plantas/bacterias=3%, $p=0.3$, correlación entre plantas/hongos=12%, $p=0.051$, Mantel test). Sin embargo, las comunidades de hongos y bacterias estuvieron fuertemente correlacionadas entre sí (correlación=72%, $p=0.001$, Mantel test). El pastoreo explicó una proporción significativamente mayor de la variación en la comunidad de plantas (37% de la variación) que la fertilización (8% de la variación), y en conjunto ambos tratamientos y su interacción explicaron 45% de la variación en la comunidad (Figura 2.9). En cambio, la fertilización y el pastoreo explicaron una proporción mucho menor de la variación de las comunidades de microorganismos (15%). Además, la fertilización explicó una proporción significativamente mayor de la variación de las comunidades de microorganismos que el pastoreo (11%, Figura 2.9), tanto para bacterias como hongos.

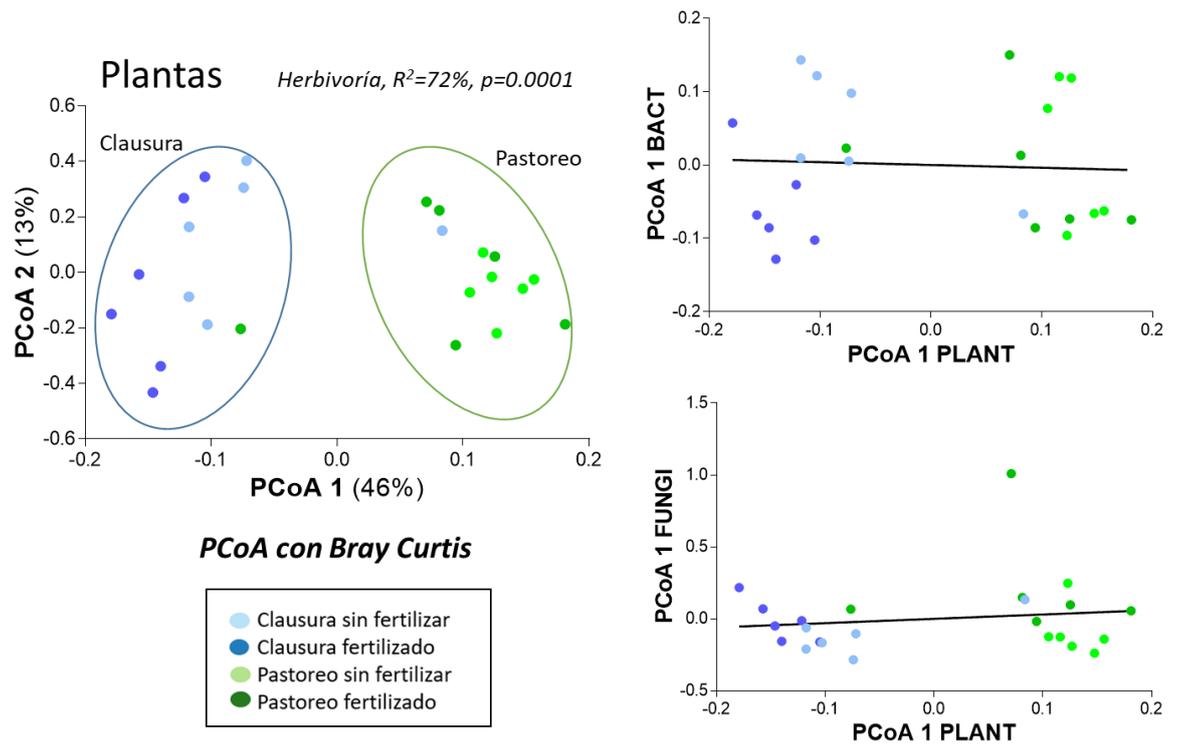


Figura 2.8. a) Análisis de coordenadas principales basado en Bray Curtis para la comunidad de plantas. b) Relación entre la coordenada principal 1 de plantas y la de bacterias. c) Relación entre la coordenada principal 1 de plantas y la de hongos.

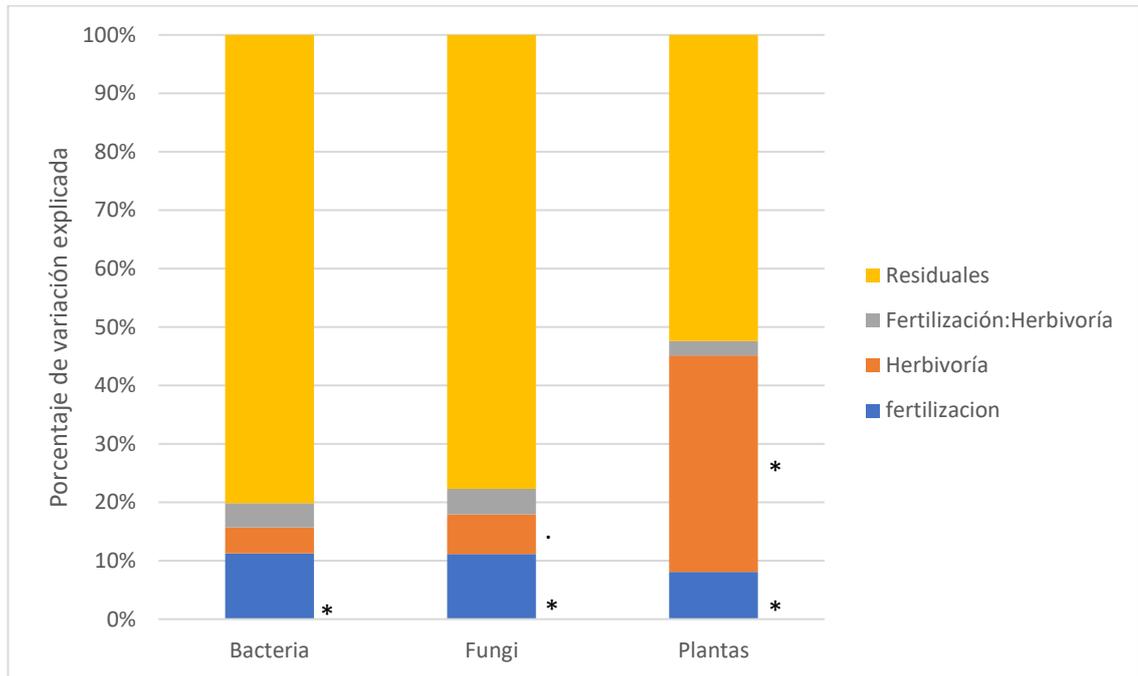


Figura 2.9. Análisis Adonis para las matrices de distancia de Bray Curtis para Plantas, y de Weighted Unifrac para Bacterias y Hongos. Con asterisco se marcan los tratamientos que implicaron un % significativo de cambio ($p < 0.05$) dentro de cada grupo de organismos, mientras que con “.” se marcó lo marginalmente significativo ($p < 0.1$).

2.3.4. Correlación con los factores ambientales

Se encontraron diferencias significativas entre los factores ambientales que controlaron la diversidad de las comunidades de bacterias, hongos y plantas. La diversidad de bacterias mostró correlaciones con las emisiones de óxido nítrico del suelo, la temperatura del suelo, el contenido de amonio del suelo, el índice verde de vegetación normalizado (NDVI), el contenido de N del suelo y la relación C:N del suelo (correlación=30% y $p=0.02$, Mantel test). Por su parte, la diversidad de la comunidad de hongos estuvo fuertemente correlacionada con el NDVI y la relación C:N del suelo, como en el caso de las bacterias, pero también estuvo explicada por la temperatura del aire, la abundancia de leguminosas, la productividad primaria neta, la biomasa total de plantas y el contenido de C del suelo (correlación=40% y $p=0.001$, Mantel test). La diversidad de plantas, en cambio, estuvo explicada por la humedad gravimétrica, el contenido de amonio

en el suelo, la radiación fotosintéticamente activa y la biomasa total de plantas (correlación=56% y $p=0.001$, Mantel test).

2.4. Discusión

Los pastizales de la Pampa Deprimida albergan una comunidad diversa de microorganismos en el suelo sensible al agregado de nutrientes y resistente a la presencia de ganado vacuno. El agregado de nutrientes alteró significativamente la composición de bacterias y hongos pero el pastoreo sólo generó cambios marginales en la composición de hongos. Estos cambios en la composición de microorganismos estuvieron asociados a cambios sustanciales en la abundancia relativa de algunos taxones. Sin embargo, dado que estos taxones eran poco abundantes, sus cambios no incidieron sobre la diversidad microbiana. A su vez, los cambios en las comunidades microbianas no se relacionaron con los cambios en las comunidades de plantas, posiblemente porque las comunidades de plantas son más sensibles a la fertilización y el pastoreo, en particular más al pastoreo que a la fertilización. En conjunto, los resultados de este capítulo indican que cuatro años de fertilización y trece de exclusión del pastoreo modificaron levemente las comunidades microbianas del suelo en contraste con los cambios contundentes que provocaron en la composición de la comunidad vegetal.

Las comunidades microbianas del suelo del pastizal, a pesar de ser sumamente diversas, estuvieron dominadas por pocas especies de bacterias y hongos. Es decir, que presentaron una gran cantidad de especies raras, con muy baja abundancia. Las comunidades microbianas suelen mostrar esta distribución sesgada de abundancia de especies (Nemergut et al. 2011). En el caso de las bacterias, un estudio reciente encontró que sólo el 2% de los taxones bacterianos representan casi la mitad de las comunidades bacterianas del suelo en todo el mundo (Delgado-baquerizo et al. 2018). Este subconjunto relativamente pequeño de bacterias que domina los suelos en todo el mundo pertenece en su mayoría a los filos Protobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria, que son los mismos grupos que dominan los suelos de la Pampa Deprimida (Figura 2.1) y la Pampa Interior (López Zieher et al. 2020). En el caso de los hongos, también hay grupos dominantes en

el suelo como el caso de los filos Ascomycota y Basidiomycota (Tedersoo et al. 2014, Egidi et al. 2019). La proporción de Ascomycota y Basidiomycota es especialmente alta en pastizales, en concordancia con los resultados que se muestran en este capítulo, en contraste con los suelos de bosques templados que muestran alta dominancia de Basidiomycota (Tedersoo et al. 2014).

Cuatro años de fertilización del pastizal modificaron las comunidades microbianas debido a cambios en la abundancia relativa de grupos taxonómicos de bacterias y hongos tal como se esperaba según la primera hipótesis de este estudio. En pastizales, un estudio que evaluó 25 sitios con diferente composición vegetal encontró cambios significativos en la comunidad de bacterias y hongos con el agregado de N y de P (Leff et al. 2015), similar a lo encontrado en este estudio con el agregado de NPK. Las bacterias responden al agregado de N de forma conservada filogenéticamente (Isobe et al. 2019). Es decir, algunos grupos de bacterias aumentan o disminuyen su abundancia consistentemente cuando se analiza su respuesta con un conjunto de datos de varias regiones del mundo. A nivel de filo, en general se observa que la abundancia relativa de Proteobacteria y Actinobacteria aumentan con el agregado de N al suelo, mientras que la abundancia de Acidobacteria disminuye (Fierer et al. 2012, Dai et al. 2018), consistente con la idea de que la fertilización favorece una comunidad microbiana copiotrófica más activa (Fierer et al. 2007). Sin embargo, un metaanálisis que compara estas respuestas con las de agregado de NPK sólo detectó aumentos significativos para Proteobacteria y no para los otros filos (Dai et al. 2018), lo que coincide con los resultados de este estudio.

Contrario a lo esperado según la hipótesis 2, ni el agregado de nutrientes ni el pastoreo modificaron la diversidad de bacterias y hongos del suelo. La adición de nutrientes a largo plazo generalmente reduce la diversidad de bacterias y hongos en el suelo, aunque los efectos varían entre ecosistemas (Wang et al. 2018). Esta disminución muchas veces se atribuye a la reducción de pH del suelo que ocurre con la fertilización, dada la fuerte asociación que existe entre la diversidad microbiana y el pH del suelo (Fierer and Jackson 2006). Sin embargo, el agregado de NPK no modificó significativamente el pH en los suelos estudiados (Capítulo 3) lo que podría explicar que

no se observaron efectos significativos en las comunidades microbianas. Por otro lado, el pastoreo tampoco afectó la diversidad microbiana, en contraposición a lo que se esperaba según la hipótesis 3. Existen pocos estudios que exploren directamente los efectos del pastoreo sobre la composición y diversidad de las comunidades microbianas. Sin embargo, el trabajo más completo sobre el tema, que incluye pastoreo por ganado doméstico y herbívoros silvestres, encontró que el pastoreo regula la heterogeneidad espacial de las comunidades microbianas al modificar el pH del suelo y la disponibilidad de recursos (Eldridge et al. 2020). Estos autores encontraron que los efectos de los herbívoros se presentaron principalmente en bosques, mientras que en pastizales sólo ocurrieron cambios en algunos grupos microbianos particulares.

Los cambios en las comunidades de microorganismos debido a la fertilización y al pastoreo no tuvieron relación con los cambios en las comunidades de plantas, en contraposición con la hipótesis 4. Esta desconexión entre plantas y microorganismos resultó inesperada dado que los cambios en las comunidades de plantas están fuertemente relacionados con la de microorganismos en suelos de la Pampa Interior y otros pastizales del mundo (Prober et al. 2015, López Zieher et al. 2020). Por ejemplo, el agregado de nutrientes puede cambiar la arquitectura de las raíces ofreciendo diferentes microhábitats y condiciones ambientales, y pueden cambiar el espectro de recursos a través de exudados radicales (Lange et al. 2015). Pero en este estudio se evaluaron las comunidades de suelo sin discriminar entre suelo rizosférico y no rizosférico por lo que la relación con la composición de plantas puede resultar menos directa que la que se presenta en la rizósfera con algunos organismos simbioses específicos, como el caso de los hongos micorrícicos (Tedersoo et al. 2014). Sin embargo, la falta de relación entre los cambios que provocan la fertilización y el pastoreo sobre las comunidades de plantas y microorganismos puede ser explicada por los distintos factores subyacentes que determinan esos cambios como se vio en la Sección 2.3.4. En el caso de las plantas, el aumento de la disponibilidad de nutrientes y de luz provocados por el efecto conjunto del agregado de nutrientes y el pastoreo promovieron cambios en la composición de plantas que resultaron en mayor productividad primaria y más abundancia de leguminosas (Campana y Yahdjian 2021). De hecho, en este sitio de estudio se encontró que la diversidad de plantas se correlacionó

positivamente con la disponibilidad de luz fotosintéticamente activa que llega al suelo (Campana y Yahdjian 2021). En cambio, los microorganismos estuvieron mucho menos influidos por la fertilización y el pastoreo (Figura 2.10) y la variación en las comunidades posiblemente esté relacionada más con cambios en el suelo que con los cambios en el ambiente por encima del suelo. Es más, las bacterias correlacionaron mayormente con el N del suelo (emisión de óxido nitroso, contenido de amonio, N total en el suelo), mientras que los hongos con el C del suelo (C total en el suelo). Si bien es cierto que las variables edáficas pueden estar influenciadas por la comunidad vegetal, no se encontraron efectos directos de la vegetación en las comunidades de microorganismos del suelo.

Las bacterias y los hongos del suelo juegan un papel clave en la regulación del ciclo del carbono, los ciclos de nutrientes y la productividad de primaria. Los resultados del estudio desarrollado en este capítulo muestran que el agregado de nutrientes y el pastoreo modifican la composición de las comunidades de bacterias y hongos pero de manera mucho más leve de lo que modifican las comunidades de plantas ya que los cambios ocurrieron en especies poco abundantes. Sin embargo, estos cambios sutiles podrían tener consecuencias importantes sobre el funcionamiento de los ecosistemas. Estudios recientes han demostrado que las especies raras pueden tener un papel desproporcionado en los ciclos biogeoquímicos y pueden ser un impulsor oculto de la función del microbioma (Jousset et al. 2017).

CAPÍTULO 3 - Efecto de la fertilización, el pastoreo y su interacción sobre los principales procesos de ciclado de nitrógeno mediado por los microorganismos del suelo

3.1. Introducción

El exceso de nutrientes y el uso de la tierra son los principales factores de cambio global que amenazan el funcionamiento y los servicios ecosistémicos. Podría decirse que los pastizales son los ecosistemas terrestres más amenazados debido a los cambios en el uso de la tierra relacionados con la agricultura y la ganadería (Hoekstra et al. 2005). Estos ecosistemas son de particular importancia porque concentran un gran porcentaje de la población humana y representan un tercio de la producción primaria neta en tierra (Chapin et al. 2011). Los pastizales bajo uso ganadero deberían manejarse no sólo con el objetivo de maximizar el suministro de forraje para el ganado, sino también para mantener las funciones ecosistémicas claves que proporcionan, como la retención de nutrientes y carbono, la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero y el mantenimiento de biodiversidad entre otros (Sala et al. 2017, Hautier et al. 2018). Además de la presión de uso intensivo con fines productivos, los pastizales se encuentran afectados por otros componentes del cambio global como el cambio climático (calentamiento global y mayor frecuencia de eventos extremos), aumentos en los nutrientes por deposiciones atmosféricas o deriva de fertilizantes de campos vecinos, y cambios en la biodiversidad (extinciones, invasiones biológicas, etc.) con consecuencias drásticas en los ciclos globales de agua y nutrientes (Vitousek et al. 1997a, Borer et al. 2017). De hecho, todos estos componentes del cambio global actúan simultáneamente produciendo impactos en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Vitousek and Hooper 1993, Flombaum et al. 2017, Komatsu et al. 2019), que a su vez pueden tener efectos de retroalimentación, amplificando o alterando la dirección del cambio a lo largo del tiempo (Borer et al. 2014).

El ciclo del nitrógeno es muy dinámico ya que tiene muchos procesos sensibles a los cambios antrópicos como las emisiones de óxido nitroso (N_2O), que pueden aumentar rápidamente si hay una gran entrada de N al suelo por ejemplo por fertilización. Sin embargo, las salidas de nitrógeno de los ecosistemas a través de las emisiones de N_2O tienen procesos compensatorios de entrada, como la fijación biológica de nitrógeno por microorganismos simbióticos o de vida libre en los suelos. Estudiar todo el ciclo del N sería la única forma de evaluar el equilibrio de entradas y salidas, y los impactos del

cambio global en la dinámica del N en los pastizales. Por otro lado, los factores de cambio son muy variados y pueden tener efectos contrastantes en el ciclado de N. En este estudio se concentró el interés en dos impulsores del cambio global que están comprometiendo la provisión de servicios ecosistémicos, especialmente en los pastizales más vulnerables, el pastoreo con ganado doméstico y el enriquecimiento de nutrientes.

Los pastizales con una larga historia de pastoreo se han transformado profundamente, por ejemplo, se modificaron la composición y estructura de la vegetación, la productividad primaria, los ciclos de nutrientes, etc. Los efectos del pastoreo en los pastizales implican efectos en el ciclo del N tanto directos como indirectos (Delgado-Baquerizo et al. 2016), que pueden clasificarse como impulsores proximales (efectos directos a corto plazo) y distales (efectos indirectos a largo plazo; Chapin et al. 2011). El pastoreo por ganado doméstico puede afectar los procesos del suelo al disminuir la biomasa vegetal aérea porque provoca la mortalidad de las raíces y aumenta la exudación de las raíces (Fig. 3.1; Dyer et al. 1982; Lemaire et al. 2000). A su vez, el pastoreo provoca cambios en las comunidades vegetales del suelo, perjudicando a las especies que le resultan más palatables, como ser las leguminosas, si tiene la posibilidad de seleccionar su alimento. Ante esa situación, al haber poca abundancia de leguminosas y, por ende, poca fijación simbiótica de N, toman un rol más importante las bacterias fijadoras de N de vida libre. Por otra parte, los excrementos del ganado (impulsor proximal) aceleran los ciclos de nutrientes en comparación con los pastizales sin pastoreo (Bardgett et al. 1997; Lindsay et al. 2010) y también podrían crear regiones de intensa actividad microbiana (Sitters et al. 2020). Por lo tanto, podríamos esperar mayores tasas de ciclado de N en pastizales pastoreados, lo que implica mayores emisiones de metano y óxido nitroso a la atmósfera (Groffman et al. 2009). Sin embargo, los efectos del pastoreo sobre las emisiones de óxido nitroso y otros gases de efecto invernadero no son uniformes en todos los ecosistemas por lo que es importante avanzar en las estimaciones de cambios desde ecosistemas poco estudiados (Frank et al. 2000; Le Roux et al. 2003; Wolf et al. 2010).

Los cambios en la comunidad vegetal provocados por el pastoreo también pueden implicar alteraciones en la calidad y/o cantidad de nutrientes que ingresan al suelo,

modificando así los stocks y flujos de múltiples nutrientes en el suelo (Milchunas et al. 1988; Risch et al. 2020; Sala et al. 1986; Sitters et al. 2020). Por ejemplo, el pastoreo de alta intensidad reduce la abundancia de leguminosas, que suelen ser más consumidas por el ganado que las gramíneas debido a su palatabilidad (Rutter 2006), disminuyendo así la fijación simbiótica de nitrógeno en el suelo (Frankow-Lindberg y Dahlin 2013). Sin embargo, también podría ocurrir lo contrario, cuando el pastoreo con cargas moderadas beneficia la abundancia de leguminosas y otras especies subordinadas gracias a la reducción de gramíneas muy abundantes, produciendo un efecto indirecto positivo sobre las leguminosas (Koerner et al. 2018). De lo que no caben dudas es que el pastoreo es un formador de ecosistemas ya que cambia los rasgos de las plantas, sus comunidades y las tasas de ciclo de nutrientes; y, a largo plazo, puede inducir la coevolución de las especies de plantas que se consumen. Descubrir el efecto del pastoreo en los sistemas vulnerables en los cuales se introduce debería ser una prioridad en la situación actual de cambio global.

El enriquecimiento de nutrientes perturba el ciclo de los mismos y altera las funciones del ecosistema estrechamente relacionadas con los servicios ecosistémicos, como la producción de forraje, la producción de alimentos, el secuestro de C (Galloway et al. 2008). El enriquecimiento de nutrientes puede alterar muchos procesos y la cantidad de nitrógeno reactivo que circula en los ecosistemas al cambiar sus impulsores proximales y distales (Fig. 3.1). El impacto que podría tener el enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema natural podría cambiar en gran medida la diversidad de plantas y animales, el funcionamiento de los ecosistemas y los servicios de los ecosistemas. Por ejemplo, la fertilización con N puede aumentar las emisiones de óxido nitroso de los suelos bajo uso ganadero (Mosier et al. 1991) al aumentar el contenido de nitrato en el suelo (impulsor proximal) o al aumentar la calidad de las plantas y la broza que éstas producen (impulsores distales). El N_2O producido por la actividad de los microorganismos nitrificantes y desnitrificantes en el suelo (Fig. 3.1) es un potente gas de efecto invernadero que también destruye la capa de ozono en la estratosfera (Tian et al. 2020). La reducción de las tasas de emisión de este gas es una prioridad para reducir las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera y regular el cambio

climático. Estudios anteriores demostraron que los impulsores proximales del N_2O son principalmente la temperatura, la humedad del suelo (más específicamente el porcentaje espacio poroso del suelo lleno de agua) y el contenido de amonio y nitrato del suelo (Chapin et al. 2011). La disponibilidad de oxígeno en el suelo que maximiza las emisiones de N_2O es entre intermedia y alta. La oxidación N_2O de N_2 requiere oxígeno, por lo que si el anegamiento es total también hay baja emisión de N_2O . Un ambiente edáfico húmedo con sitios anaerobios favorece la emisión de N_2O siempre y cuando el anegamiento no sea total. Los factores de control distales incluyen la productividad primaria neta aérea, la biomasa vegetal total, la abundancia de leguminosas, la cantidad de luz fotosintéticamente activa, el nitrógeno en la biomasa microbiana, el contenido de C y N del suelo y su relación (relación C:N de la materia orgánica del suelo) (Chapin et al. 2011; Robertson et al. 1999, Figura B1). Las actividades agrícolas realizadas en el ecosistema natural que modifiquen estos factores modificarán las tasas de emisión de N_2O a la atmósfera.

Compensando las salidas de nitrógeno de los ecosistemas por volatilización o emisión de óxido nitroso, hay flujos de entrada (Fig. 3.1), siendo la fijación biológica de N uno de los más importantes. En ecosistemas con poca abundancia de leguminosas, las únicas especies de plantas capaces de establecer una simbiosis con bacterias fijadoras de N, como son la mayoría de los pastizales templados, la fijación de N por microorganismos de vida libre cobra relevancia como aporte de N (Fig. 3.1; Reed et al. 2011). La fijación de N por microorganismos de vida libre representa un aporte promedio de $4.7 \text{ kgN ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ con un rango amplio de $0.1\text{-}21 \text{ kgN ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$, mientras que la fijación simbiótica está entre 1 y $10 \text{ kgN ha}^{-1} \cdot \text{año}^{-1}$ para pastizales templados (Reed et al. 2011). Los microorganismos fijadores de N de vida libre pueden ser bacterias o arqueas heterótrofos o autótrofos, y son ubicuas, pueden estar en el suelo, como también en el canopeo y la broza de las plantas, por ejemplo (Reed et al. 2011). Todas ellas poseen enzimas nitrogenasas que permiten fijar el N_2 atmosférico a un alto costo energético, requieren mucho ATP, y, por consecuencia, P (Reed et al. 2011). El proceso de fijación de N es inhibido por la presencia de N en el suelo, pero favorecido por P. El fósforo (P) es otro macronutriente cuya abundancia está disminuyendo en los pastizales bajo uso ganadero

o cultivo debido a las exportaciones agrícolas que no se compensan con la fertilización (Cruzate GA y Casas R 2012, Jobbágy et al. 2021). En muchos casos, la adición de N podría no ser efectiva para estimular el crecimiento de plantas y bacterias si existe una co-limitación con el P. De hecho, el crecimiento de las leguminosas es estimulado por la adición de P más que por la adición de N (Tognetti et al. 2021). Además, el P podría estimular el ciclo del N, de modo que haya más N para la nitrificación y desnitrificación, favoreciendo la emisión de N_2O de los suelos. Las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno también han mostrado una respuesta positiva a la adición de P y NP porque el P es parte de la molécula ATP como fuente de energía del proceso (Reed et al. 2011). El enriquecimiento de nitrógeno ciertamente afectará el ciclo de nutrientes directa e indirectamente, pero debemos comprender los mecanismos para poder predecir y gestionar las consecuencias sobre los servicios de los ecosistemas.

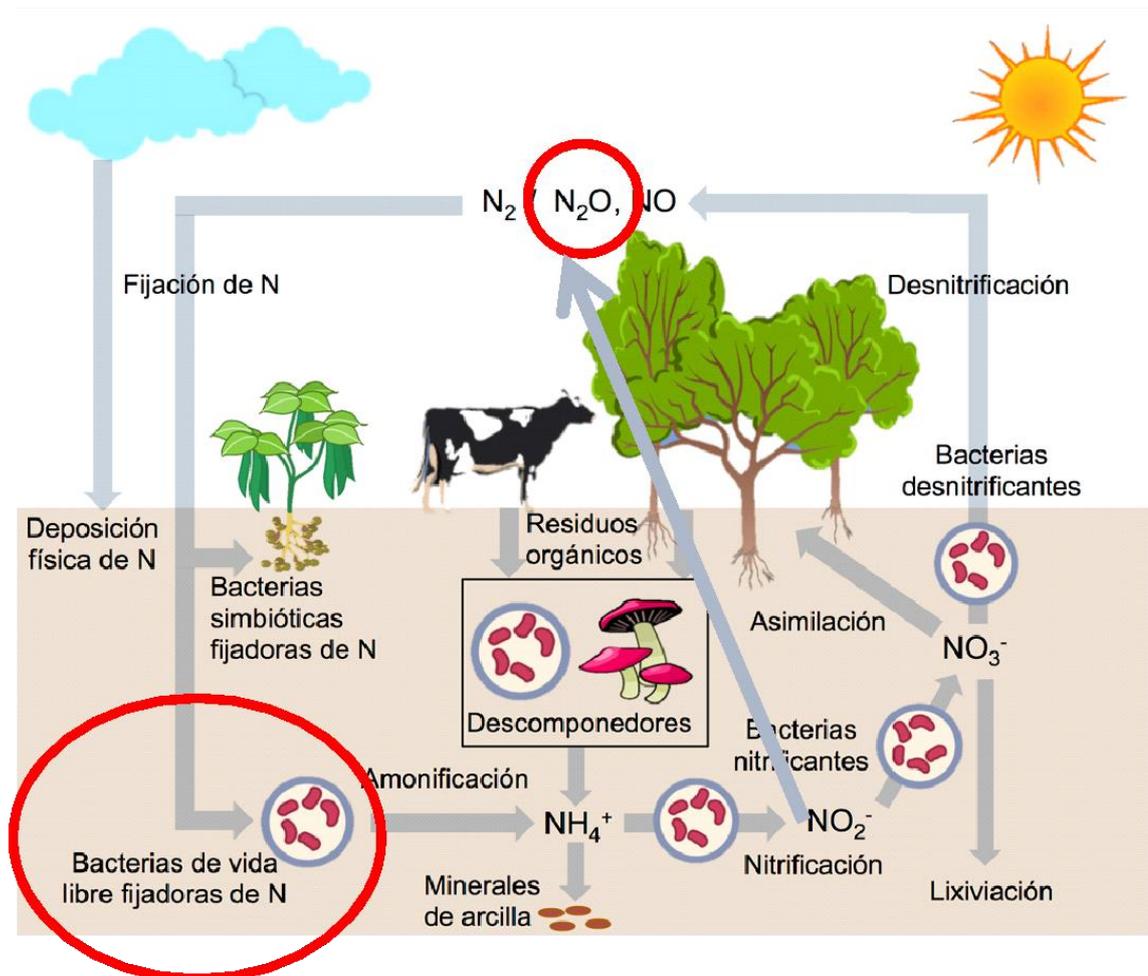


Figura 3.1. Ciclo de nitrógeno en agroecosistemas. Con círculos rojos se muestran los dos procesos, uno de entrada (la fijación biológica de nitrógeno por organismos de vida libre) y otro de salida de N (las emisiones de N₂O) de los pastizales bajo uso ganadero que fueron el foco de este estudio. Adaptado de *Silvia Pajares Moreno, OIKOS, septiembre-diciembre 2017, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Oikos 3.0, 2016.*

En la Región Pampeana Argentina la producción ganadera se realiza históricamente en pastizales naturales (Oita et al. 2016). La Pampa Deprimida no es apropiada para la producción agrícola debido a las inundaciones durante el invierno, pero tiene condiciones adecuadas para la cría de vacas en pastos naturales, y tiene una larga historia de pastoreo. Los pastizales pampeanos cubren una gran superficie que comprende más de 170.000 km² y son económicamente muy importantes. Los pastizales de la Pampa proporcionan, además de la producción de forraje, una amplia gama de servicios ecosistémicos como la purificación del agua, la regulación de inundaciones y la provisión de alimentos de animales silvestres (principalmente carne de liebre y ñandú). Una enorme biodiversidad sustenta estos servicios ecosistémicos, incluyendo pastos, insectos, pequeños mamíferos, aves, etc. (Sala et al 2017). El uso continuo de los pastizales en Argentina ha provocado disminuciones en su productividad y biodiversidad (Deregibus 1995; Viglizzo et al. 2011). Sin embargo, el pastoreo puede controlar las invasiones de plantas como la de *Festuca alta* (Spirito et al. 2014). En estos pastizales, el pastoreo generalmente se maneja sin fertilización, pero la fertilización con nutrientes es una práctica que se ha incrementado durante la última década (Jobbágy et al. 2021). El enriquecimiento de nutrientes a través de deposiciones y escorrentías sigue siendo una amenaza menor, pero podría implicar cambios importantes en estos ecosistemas. Por otro lado, el aumento de la carga ganadera y, en consecuencia, el sobrepastoreo, podría poner en peligro los servicios ecosistémicos que proporcionan los pastizales pampeanos. Por el contrario, la exclusión de herbívoros se ha propuesto como una herramienta para la conservación de los pastizales, pero sus beneficios se han cuestionado en un contexto enriquecido con nutrientes (Sun et al. 2020).

Los estudios de la dinámica de N en los pastizales de la Pampa Deprimida se han centrado en variables de estado como el contenido de N en el suelo y en los reservorios

en las plantas, encontrando por ejemplo que la mayor parte de C en los pastizales se acumula de forma subterránea, ya sea en plantas como en el suelo (Chaneton et al. 1996). En este trabajo, en cambio, se evaluaron experimentalmente flujos importantes del ciclo del N poco estudiados en los pastizales bajo uso ganadero como las emisiones de óxido nitroso y la fijación biológica de nitrógeno (Fig. 3.1). Esta evaluación se realizó a través de un experimento manipulativo a campo con exclusión de ganado y enriquecimiento de nutrientes (fertilización con NPK + micronutrientes). Específicamente, se exploraron las siguientes preguntas: 1) cómo cambian las emisiones de N_2O , la fijación biológica de N y en la Pampa Deprimida con la exclusión del ganado y la adición de nutrientes, y 2) cuáles son los principales factores (proximales y distales) que explican estos cambios. Se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1) La fertilización con NPK altera el ciclado de C y N mediados por los microorganismos del suelo, acelerando los flujos de pérdida de C y N hacia la atmósfera, y reduciendo los flujos naturales de entrada de N a los ecosistemas. Se espera que la fertilización con NPK aumente la emisión de N_2O por dos vías no excluyentes: por un lado por el aumento del sustrato para el proceso de desnitrificación en un ambiente edáfico combinado con baja disponibilidad de oxígeno, y por el otro, como consecuencia de la imposibilidad de las plantas para absorber la totalidad del N agregado con el fertilizante. Se espera además que aumenten la tasa de respiración de suelo y la mineralización del N al verse estimulada la actividad microbiana con el exceso de nutrientes. Por otro lado, se espera que la fertilización con NPK reduzca la fijación de N de microorganismos de vida libre, que absorberán directamente el N del suelo en lugar de fijarlo desde la atmósfera con mayor costo energético.

Hipótesis 2) El pastoreo acelera los procesos de ciclado de C y N por la mayor productividad de las plantas, y por el aporte de orina y heces que implican mayor tasa de entrada de carbono y nutrientes al suelo. Sin embargo, el pastoreo podría provocar mayor emisión de óxido nitroso si generara más sitios anaerobios por el pisoteo. Se espera que la exclusión de herbívoros ralentice las tasas de transformación de N y que el ciclo de nitrógeno se haga más cerrado, disminuyendo la fijación de N al reducir la actividad

fotosintética de las bacterias fijadoras de N (cianobacterias) a medida que llega menos luz al suelo.

Hipótesis 3) También se espera que la exclusión del ganado y la adición de nutrientes en forma conjunta alteren el ciclado del N como resultado de los cambios individuales que van en direcciones opuestas, con una desaceleración sin pastoreo y una aceleración con la adición de N. El pastoreo podría aumentar la fijación biológica de N por microorganismos de vida libre porque aumenta la cantidad de luz, lo que combinado con el agregado de fertilizante que contenga P (nutriente esencial para el funcionamiento de la nitrogenasa por el aporte energético del ATP) podría estimular la fijación biológica de N. De hecho, el agregado combinado de N y P suele ser beneficioso para las bacterias fijadoras de N del suelo (Reed et al. 2011).

Este estudio permitirá una mejor comprensión de los efectos antropogénicos en el ciclado de N en los pastizales templados, lo que proporcionará el conocimiento para minimizar los procesos de degradación del suelo y garantizar la provisión de servicios ecosistémicos claves.

3.2. Metodología

La descripción del sitio de estudio y el diseño experimental figuran en el capítulo 1 de esta tesis. En las parcelas experimentales se midieron procesos del suelo (actividad nitrogenasa, emisión de óxido nitroso, mineralización neta de nitrógeno y respiración de suelo) durante una temporada de crecimiento (noviembre de 2016 a abril de 2017) con una frecuencia mensual en la mañana entre las 10 y las 12 hs o en la tarde 16 a 18 hs, evitando así las horas de mayor calor. Al final del período, se analizaron propiedades edáficas vinculadas con la dinámica del N (materia orgánica y contenido total de N en las fracciones MOP y MOAM en el suelo, y en la biomasa microbiana) y atributos de la vegetación (diversidad vegetal, productividad primaria neta, biomasa aérea y subterránea) en pastoreo y clausuras al pastoreo, usando la metodología que se describe más abajo. Estas variables fueron utilizadas en los modelos para explicar los controles de los principales procesos de salida y entrada de N en este pastizal como se explica más abajo.

3.2.2. Variables de respuesta

Emisiones de N₂O

La medición de las emisiones de N₂O se realizó a campo utilizando la metodología de cámara estática (Parkin y Venterea 2010) durante las mismas fechas y en las mismas parcelas donde se midió la fijación biológica de N, excepto en abril de 2017 que debido a restricciones logísticas esta medición no se pudo realizar. En cada fecha de medición se instalaron bases de hierro (0.2 m²) enterradas 10 cm en el suelo en todas las parcelas (Fig. 3.2). Estas bases tienen una canaleta que permite poner una cámara encima. Las dimensiones de las cámaras fueron 37 cm de largo x 25.5 cm de ancho x 14 cm de alto, y estaban cubiertas por una lámina de aluminio reflectante y ventiladas con un tubo de acero inoxidable de 10 cm de largo (Parkin y Venterea 2010). Durante el tiempo de muestreo, las cámaras fueron colocadas sobre bases de hierro 10 cm de profundidad previamente y selladas con agua para evitar pérdidas no deseadas. En la parte superior las cámaras poseen unos conductos y una válvula por poder tomar la muestra de la atmósfera mediante una bomba de presión negativa (Fig. 3.2). En cada fecha y parcela se tomaron tres muestras de la atmósfera dentro de cada cámara, durante la mañana entre las 10 y las 12 hs o en la tarde 16 a 18 hs evitando así las horas de mayor calor, que se almacenaron en viales de vidrio. La primera muestra se tomó inmediatamente después de colocar la cámara (T0), la segunda luego de incubar los suelos durante 15 minutos (T1) y la tercera a los 30 minutos (T2), para analizar la tasa de emisión de gases a partir del contenido de N₂O y CO₂ en las muestras por cromatografía gaseosa. Las muestras de aire de las cámaras se analizaron dentro de los 10 días de la recolección con el cromatógrafo del Laboratorio de Servicios Analíticos Especiales de la Facultad de Agronomía (GC, 6890 Agilent Technologies Network). Se calculó el flujo de N₂O de cada muestra a través del modelo lineal, considerando el volumen atmosférico de la cámara, la temperatura del aire y el tiempo de incubación (Parkin y Venterea 2010). Después de cada muestreo, las bases se extrajeron y reubicaron en la misma parcela para permitir la estabilización del suelo antes de la siguiente fecha de muestreo. Esta relocalización también fue útil para evitar la correlación temporal entre las muestras en las sucesivas fechas de muestreo.



Figura 3.2. Detalle de la cámara de incubación conectada a la bomba de vacío para la toma de muestras de gases emitidos por el suelo.

Fijación de N por microorganismos de vida libre

Se estimó la fijación de N por microorganismos de vida libre en el suelo a través de la actividad nitrogenasa, midiendo mensualmente durante una estación de crecimiento, desde noviembre de 2016 hasta abril de 2017. La enzima nitrogenasa es la que permite a ciertos microorganismos reducir el triple enlace del nitrógeno (N_2) presente en la atmósfera a amonio. Esta enzima también puede usar el acetileno como sustrato, rompiendo su triple enlace para producir etileno. El etileno es un gas inerte que no es producido naturalmente por el suelo ni es metabolizado o emitido por los microorganismos ni por las raíces de las plantas, y puede medirse fácilmente por cromatografía. La actividad nitrogenasa da cuenta de la capacidad potencial de los microorganismos nitrificantes de vida libre de fijar N de la atmósfera (Fig. 3.3).

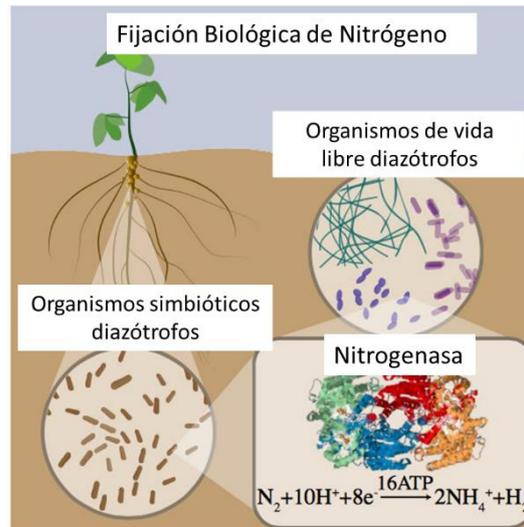


Figura 3.3. Detalle del proceso de fijación biológica de nitrógeno a través de simbiosis con plantas (izquierda) o por organismos de vida libre (derecha). Adaptado de Brookhaven National Laboratory.

Aprovechando la capacidad de usar el acetileno como sustrato y reducirlo a etileno, se incubaron suelos con su estructura intacta en cámaras herméticas transparentes (Fig. 3.4) durante 7 horas en concentraciones saturantes de acetileno, para estimar la actividad nitrogenasa en lo que es conocido como el método de reducción del acetileno (Hardy et al., 1973). Brevemente, se tomaron muestras de suelo intactas (5 cm de profundidad y 5 cm de diámetro) de las 4 parcelas de los tratamientos repetidas en los 6 bloques independientes, que se colocaron en cámaras selladas y se transportaron al laboratorio para la posterior incubación. También se incluyeron cámaras vacías como controles metodológicos. Los suelos se humedecieron al 60% de la capacidad de retención de agua del suelo para estimular la actividad de la nitrogenasa en condiciones óptimas. Las cámaras tenían un espacio atmosférico transparente de 5 cm de altura donde se tomaron las muestras de aire de 10 cm³ cinco minutos después de humedecer los suelos. Luego, se inyectó 10 cm³ de gas acetileno en cada cámara y se realizó la incubación durante 7 horas a 25°C con luz. Se recolectaron muestras de aire después de la incubación para analizar en un cromatógrafo de gases (GC) las concentraciones de acetileno y etileno en el laboratorio la Facultad de Agronomía de la UBA (el acetileno se mide como control metodológico). La producción de etileno equivale al resultado de la actividad de la

enzima nitrogenasa en una atmósfera saturada de acetileno. Luego, la concentración de etileno se corrigió por la densidad aparente del suelo, el tiempo de incubación, el volumen de la cámara y un factor de conversión $C_2H_4:N_2$ de 3 para tener la actividad nitrogenasa, que es una buena estimación para suelos (Soper et al. 2021). Se midió el acetileno para alcanzar la saturación de este gas en las cámaras. Se utilizaron cámaras vacías para controlar que ninguno de los materiales de la cámara, el agua añadida o las jeringas estuvieran contaminadas con etileno (fig. 3.4).



Figura 3.4. Detalle de una de las cámaras de incubación de suelo para el enriquecimiento de la atmósfera con acetileno.

Otras variables de respuesta relacionadas con el ciclado de N

En la misma estación de crecimiento, se estimó la mineralización neta de N a campo mediante incubaciones de suelo en los primeros 10 centímetros con tubos de PVC que contenían resinas de intercambio iónico (Raison et al. 1987). Brevemente, se utilizaron tubos de metal de 12cm que se enterraron 11cm en el suelo y se retiraron delicadamente para no disturbar el suelo contenido en el tubo. Luego, se colocó una resina en el centímetro vacío de la parte superior, y se retiró un centímetro de suelo de la parte inferior del tubo para colocar la segunda resina. El tubo se volvió a colocar en el suelo y se lo dejó incubando por 6 semanas. Luego fue retirado y enviado al laboratorio de Dres. Zimmermann y Risch en el Swiss Federal Institute for Forest en Suiza donde se analizó el contenido de nitrato y amonio en las resinas. El suelo y las resinas se analizaron en

extractos de KCl 2N para determinar el contenido de N inorgánico antes y después de la incubación. Por otro lado, con una submuestra de los suelos, se realizó una incubación en condiciones óptimas en el laboratorio para estimar la mineralización potencial de nitrógeno. Una submuestra de suelo antes y después de la incubación se extrajo con el mismo método que el descrito arriba. La incubación en el laboratorio y análisis de esos extractos se realizó en el laboratorio de la Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL, en Suiza, donde se determinaron las concentraciones de amonio y nitrato en todos los extractos.

Al final de la estación de crecimiento, se midió la biomasa microbiana con el método de fumigación-extracción con cloroformo, que permite determinar el C y N en la biomasa microbiana (Paul et al. 1999). La técnica se basa en exponer el suelo a vapores de cloroformo, el cual destruye las membranas de los microorganismos y libera los componentes celulares. El C microbiano liberado fue extraído, luego, mediante una digestión con K_2SO_4 con un analizador TIC/TOC (Laboratorio INIFTA, La Plata). Posteriormente se comparó el contenido de C de la muestra fumigada con el proveniente de una muestra control del mismo suelo que no fue fumigada. Para determinar el N en la biomasa microbiana, se extrajo el N total de las muestras fumigadas y no fumigadas mediante una digestión Kjeldahl (Robertson et al. 1999a) realizada por un analizador automático disponible en FAUBA, Cátedra de Cereales (Paul et al. 1999).

Adicionalmente, se midió el nitrógeno total de los suelos extraídos de todas las parcelas y se hizo el fraccionamiento de la materia orgánica del suelo considerando la Materia Orgánica Particulada (MOP) y en la Materia Orgánica Asociada a Minerales (MOAM) en los suelos. El Carbono y nitrógeno en MOP y MOAM se estimó de muestras compuestas de suelo tamizadas a 2 mm que luego fueron separadas en las fracciones MOP y MOAM (Cambardella and Elliott 1992). Con una submuestra de suelo se estimó la densidad aparente del suelo para poder expresar los valores en términos de masa o volumen de suelo según el caso. Todas las muestras de suelos se secaron en la estufa a 60-70°C durante 72 hs y luego se molieron utilizando un molinillo analítico (IKA®, modelo A20). Los contenidos de C y N en muestras de suelos fueron analizados por

combustión seca en un analizador elemental LECO, en el laboratorio de biogeoquímica del IFEVA-FAUBA.

Procesos de suelo relacionados con la actividad de los microorganismos

Para describir la actividad general de los microorganismos del suelo, se estimó la respiración potencial del suelo en el laboratorio, incubando los suelos en condiciones controlados. Esta medida refleja la respiración de los microorganismos del suelo utilizando la materia orgánica disponible en el mismo, y no incluye la respiración de raíces ni la de la broza. Se usó suelo de los cuatro tratamientos y los 6 bloques (0-10 cm profundidad) previamente tamizado con tamiz de 2 mm para extraer raíces y restos de plantas. El suelo se incubó en frascos herméticos de vidrio color caramelo a 25 °C y capacidad de campo durante 14 días (Robertson et al. 1999b). Se midió la tasa de respiración a los 1, 3, 7 y 14 días inyectando el aire incubado con una jeringa en un respirómetro EGM-4 PP Systems que dio valores de CO₂ en ppm. Luego de la toma de muestras, se ventiló con aire la atmósfera dentro de las cámaras para evitar que se sature en CO₂.

Variables auxiliares

En cada momento de muestreo se registró la temperatura del aire y del suelo (0-10 cm) mediante termómetros junto a cada cámara de medición de óxido nitroso antes y después de la incubación. Después de la recolección del gas dentro de las cámaras, se tomaron 3 submuestras de suelo de 10 cm de profundidad del interior de cada base usando un barreno de 2 centímetros de diámetro y se hizo una muestra compuesta para el análisis. Las muestras se pesaron en húmedo y con la estimación del volumen (ancho del barreno y profundidad de la muestra) se calculó la densidad aparente. Luego, se analizó el contenido de agua y las concentraciones de NH₄⁺ y NO₃⁻ del suelo en el laboratorio en el plazo de 10 días después de la recolección. Para ello, se secó una submuestra de 5 g a 105°C durante 48 horas para estimar el contenido gravimétrico de agua del suelo (g/g) y luego se calculó el WFPS usando la densidad aparente de cada muestra. Para estimar los contenidos de NH₄⁺ y NO₃⁻, se utilizó la técnica de microdestilación por arrastre de vapor

y realizando las extracciones de las submuestras de suelo con SO_4K_2 (Keeney y Nelson 1983). Brevemente, se pesaron 10 g de suelo húmedo de cada muestra y luego se le agregaron 50ml de la solución extractante. Se agitó por 2 horas y luego se filtró con filtro de papel Whatman GP40. Luego, se enviaron las muestras al INTA Balcarce donde se realizó la destilación por arrastre de vapor para la determinación del amonio y nitrato de suelo.

Finalmente, se midieron atributos de la vegetación en el contexto de otra tesis doctoral (Campana 2020), como la composición vegetal, la cobertura y la biomasa vegetal, y la disponibilidad de luz sobre el suelo (PAR) siguiendo los protocolos de la red de Nutrientes “NutNet” (https://nutnet.org/exp_protocol). Durante todos los años del experimento, en marzo y noviembre, que corresponden a fines del verano y fines de la primavera respectivamente, se evaluó la composición vegetal y la cobertura por especie utilizando un método modificado de Daubenmire (Daubenmire 1959) en una subparcela no perturbada de 1 m² marcada en forma permanentemente. La biomasa vegetal se estimó recortando a nivel del suelo toda la biomasa aérea de plantas individuales dentro de franjas de 0.2 m². La disponibilidad de luz se midió al mismo tiempo y en la misma subparcela de 1 m² utilizada para las mediciones de composición de especies, con un fotómetro debajo y encima del dosel. La biomasa subterránea se midió en marzo de 2016 usando un barreno de suelo para tomar muestras de hasta 10 cm de profundidad. Luego, los suelos se tamizaron y se suspendieron en agua para no subestimar las raíces más pequeñas. Estas variables relacionadas con la comunidad vegetal se usaron en esta tesis para correlacionar las variables de las comunidades del suelo con la parte aérea de cada parcela experimental.

3.2.3. Análisis estadístico

Para modelar las emisiones de óxido nitroso se ajustó un primer modelo mixto general con una distribución gamma (glmer, paquete lme4 de R). Luego se decidió aplicar una transformación logarítmica a los datos de fijación biológica de nitrógeno. Se incluyó la fecha como efecto aleatorio en ambos modelos porque es la manera de evaluar el efecto

de los tratamientos (Pastoreo y Fertilización) independiente del momento de muestreo. El diseño de parcelas divididas se incluyó en el efecto aleatorio. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas de los modelos. Posteriormente, se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos.

También se evaluó la importancia de los días desde la aplicación del fertilizante hasta las mediciones de emisiones de óxido nitroso. Se calculó una relación de respuesta estimada como la diferencia entre la emisión en el tratamiento control y en las parcelas fertilizadas, dividida por la emisión promedio en las parcelas control, sin fertilizar. Luego se ajustó un modelo de efectos mixtos ajustado por REML a estos datos.

Se utilizó un modelo más específico para evaluar la importancia de los factores proximales y distales para las emisiones de óxido nitroso. Los factores proximales elegidos fueron la temperatura del aire, la temperatura del suelo, la humedad del suelo, el espacio poroso lleno de agua (WFPS) y las concentraciones de amonio y nitrato. Para los factores distales, se evaluó la biomasa vegetal, la luz a nivel del suelo (PAR), la cobertura verde, la cobertura vegetal total, el contenido de N total del suelo, la relación C:N del suelo, el N en la biomasa microbiana y la abundancia de leguminosas. Las diferentes combinaciones de variables para construir a los modelos se evaluaron a través de AIC para elegir el mejor modelo.

3.3. Resultados

3.3.1. Efectos del pastoreo y la fertilización sobre las emisiones de óxido nitroso

El valor medio de emisión de N_2O medido durante la estación de crecimiento fue $8.13 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ y la mediana $6.54 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$, con un mínimo de 0.17 y un máximo de $35.77 \mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$. Hubo una tendencia a mayores emisiones durante la última fecha de muestreo, marzo de 2017, pero no difirieron significativamente de otras fechas. A pesar de los grandes patrones de variabilidad temporal y espacial, el aumento general de las emisiones de óxido nitroso con la fertilización fue evidente (Fig. 3.5, recuadro). De hecho, las emisiones de óxido nitroso fueron mayores en las parcelas fertilizadas que sin fertilizar, aunque las diferencias fueron marginalmente significativas (Fig.3.5, recuadro;

$p=0.092$). El pastoreo no tuvo un efecto significativo en las emisiones de N_2O y no hubo interacción con la fertilización (Fig. 3.5). Respecto de la variabilidad de las mediciones, se analizó el coeficiente de variabilidad (desvío estándar dividido la media) de los 4 tratamientos (ClausuraSinFert: 0.59, ClausuraConFert:0.71, PastoreoSinFert:0.52, PstoreoConFert:0.71) y el análisis de Kruskal Wallis determinó que no había diferencias significativas ($p=0.78$).

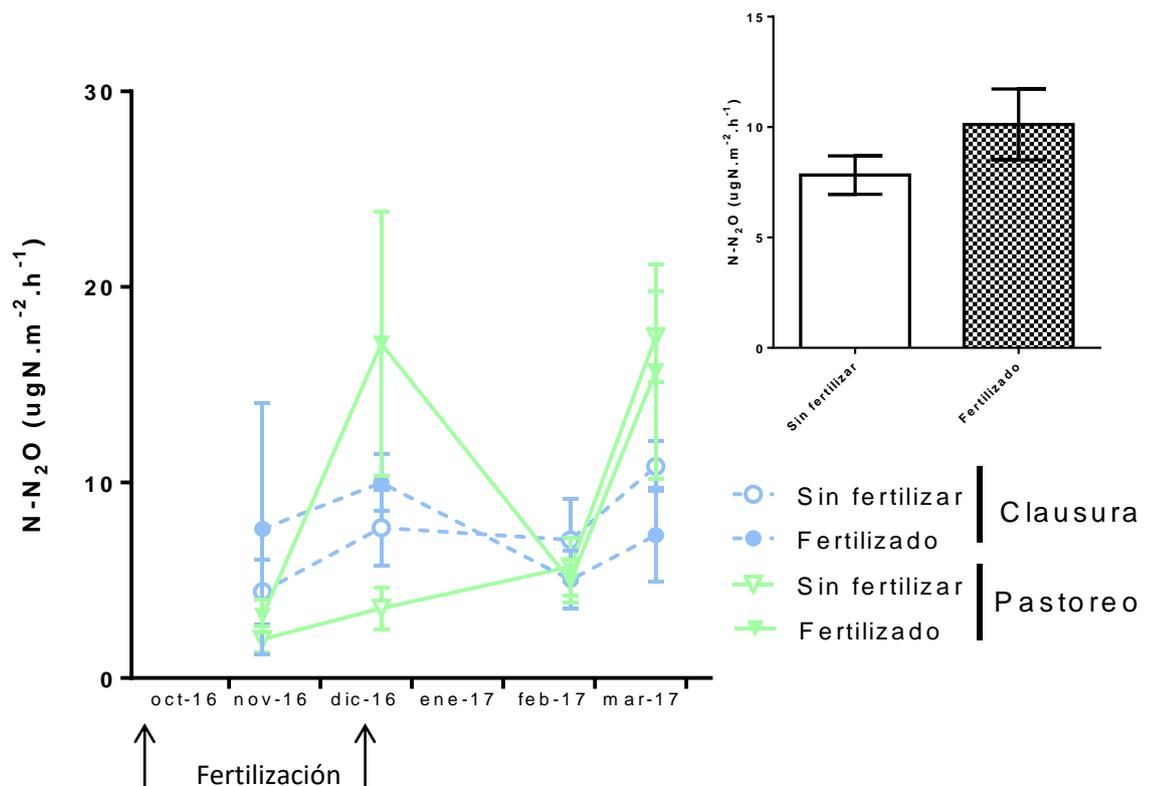


Figura 3.5. Emisiones de óxido nitroso ($\mu\text{gN m}^{-2} \text{h}^{-1}$) en pastizales pastoreados y clausuras con tratamientos de adición de nutrientes (NPK+) y control sin fertilizar. El gráfico recuadro muestra las emisiones medias de óxido nitroso durante toda la temporada de crecimiento considerando únicamente el tratamiento de fertilización. Las barras de error indican el error estándar.

La fertilización estimuló las emisiones de N_2O en los primeros 40 días posteriores a la aplicación (primeras dos fechas de medición), pero después de ese período, las

emisiones de N₂O de los suelos ya no fueron respondieron a la adición de nutrientes (Figura B2).

Los tratamientos modificaron algunas variables de control del flujo de óxido nitroso a la atmósfera (Cuadro 3.1). En particular, considerando las cuatro fechas de muestreo, la fertilización en ausencia de pastoreo (dentro de la clausura) mostró menores temperaturas de suelo que en la situación pastoreada. En el pastizal pastoreado en cambio, la fertilización produjo el efecto contrario, coincidente con la reducción en biomasa en pie (interacción NPK: pastoreo $p=0.004$). El pastoreo produjo también un aumento de la acidez del suelo, ya que el pH en la situación pastoreada mostró valores significativamente menores ($p=0.013$) que dentro de las clausuras. En cambio, ni la humedad del suelo ni el contenido de nitrógeno inorgánico (amonio o nitrato) variaron entre los tratamientos. Sólo se detectaron cambios en la humedad del suelo entre las fechas de muestreo dentro de la estación de crecimiento. Las precipitaciones pueden consultarse en la Figura B3 del apéndice.

Cuadro 3.1. Variables auxiliares medidas en cada fecha de medición de flujos de N durante la estación de crecimiento (noviembre 2016-abril 2017). Las variables fueron elegidas porque suelen determinar los procesos de fijación biológica de N o emisión de óxido nitroso. Los valores son promedios \pm ES ($n= 6$).

Variable	Fechas	Clausura		Pastoreo		Valor p
		Sin fertilizar	Fertilizado	Sin fertilizar	Fertilizado	
N-Amonio suelo (gN/m²)	Nov-2016	8.5e ⁻⁴ \pm 1e ⁻⁴	7.1e ⁻⁴ \pm 7.9e ⁻⁵	8.8e ⁻⁴ \pm 1e ⁻⁴	6.7 e ⁻⁴ \pm 6.6e ⁻⁵	n.s
	Dic-2016	4.2e-4 \pm 9.9e-5	1.7e-3 \pm 5.3e-4	3.9e-4 \pm 1.2e-4	5.2e-4 \pm 1.3e-4	
	Feb-2017	1.2e-3 \pm 2.3e-4	1.3e-3 \pm 2.5e-4	7.5e-4 \pm 1e-4	1.6e-3 \pm 3.7e-4	
	Mar-2017	5.6e-4 \pm 7.6e-5	4.5e-4 \pm 4.5e-5	5e-4 \pm 7.9e-9	3.6e-4 \pm 7.9e-5	
N- Nitrato suelo (gN/m²)	Nov-2016	6.6e-5 \pm 2.8e-5	1.4e-4 \pm 5.3e-5	1.5e-4 \pm 4.1e-5	1.7e-4 \pm 1.1e-4	n.s.
	Dic-2016	1.3e-4 \pm 4.2e-5	1.9e-4 \pm 8.8e-5	2.4e-4 \pm 8.5e-5	2e-4 \pm 8.5e-5	

	Feb-2017	$1.8e-4 \pm 6.3e-5$	$2e-4 \pm 4.7e-5$	$2e-4 \pm 5.7e-5$	$3.5e-4 \pm 8.6e-5$	
	Mar-2017	$1.5e-4 \pm 4.3e-5$	$1.4e-4 \pm 3e-5$	$1.7e-4 \pm 4.5e-5$	$1.8e-4 \pm 4e-5$	
Temperatura del suelo (°C)	Nov-2016	22.67 ± 0.67	20 ± 0.86	21.08 ± 0.71	22.08 ± 0.66	NPK:Past p=0.004
	Dic-2016	27.5 ± 0.88	26.33 ± 1.09	26.75 ± 0.83	29.25 ± 1.38	
	Feb-2017	28.33 ± 0.92	26.33 ± 1.02	28.67 ± 0.8	29.5 ± 0.85	
	Mar-2017	19.75 ± 0.33	18.91 ± 0.35	19.78 ± 0.4	21.17 ± 0.7	
Humedad gravimétrica (%)	Nov-2016	23.83 ± 0.4	23.67 ± 1.31	27.33 ± 1.2	24.5 ± 1.12	Fecha p<0.001
	Dic-2016	16.5 ± 0.96	17.5 ± 0.89	16 ± 0.26	16.17 ± 1.01	
	Feb-2017	14.67 ± 0.71	16.5 ± 1.09	15.33 ± 0.71	13.5 ± 1.15	
	Mar-2017	11.67 ± 2.96	11 ± 0.73	10.5 ± 1.38	12.17 ± 1.96	
WFPS (%)	Nov-2016	28.25 ± 3.07	29.42 ± 5.99	32.80 ± 1.2	27.97 ± 4.54	n.s.
	Dic-2016	7.32 ± 1.29	7.55 ± 1.36	7.33 ± 0.83	7.07 ± 1.21	
	Feb-2017	14.07 ± 2.00	14.09 ± 4.14	16.70 ± 2.61	13.74 ± 6.10	
	Mar-2017	28.12 ± 8.28	21.22 ± 9.38	38.06 ± 9.70	39.08 ± 5.83	
pH	Dic-2016	6.44 ± 0.09	6.41 ± 0.19	6.22 ± 0.11	5.88 ± 0.14	Past p=0.01
	Abr-2017	6.87 ± 0.17	6.92 ± 0.2	6.48 ± 0.11	6.62 ± 0.15	

En el modelo para evaluar estas variables de control en las emisiones de óxido nítrico se encontró que las emisiones estuvieron determinadas por la temperatura del suelo y la concentración de amonio y nitrato en el suelo como impulsores proximales

(Ecuación de resultado 1, n=96). La temperatura del suelo fue marginalmente significativa para explicar las emisiones de óxido nitroso con una ligera pendiente positiva ($p=0.065$). En cuanto a las variables distales (Ecuación de resultado 2, n=96), las emisiones de óxido nitroso se explicaron por la biomasa, la luz PAR interceptada, la relación C:N del suelo, el nitrógeno en la biomasa microbiana (NMB) y la productividad primaria neta aérea (PPNA). El óxido nitroso se correlacionó positivamente con PPNA ($p=0.004$) y negativamente con el NMB ($p=0.01$).

$N_2O = 0.17 + 0.02 * \text{Temp. Del suelo} + 0.001 * \text{Amonio} + 0.01 * \text{Nitrato}$ (Ec. resultado 1)

$\text{Log } N_2O = 2.13 - 0.14 * \text{Biomasa} - 0.08 * \text{PAR} - 0.11 * \text{C:N} - 0.19 * \text{NMB} + 0.15 * \text{PPNA}$ (Ec. resultado 2)

3.3.2. Efectos del pastoreo y la fertilización en la fijación biológica de nitrógeno

El valor medio de fijación de N fue de $0.017 \mu\text{g N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, con un mínimo de 0.0017 y un máximo de $0.075 \mu\text{g N.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Los valores de fijación más altos ocurrieron durante abril de 2017. La adición de nutrientes estimuló la fijación biológica de N más cuando el ganado estaba presente que en su ausencia, como lo demuestra la interacción significativa entre el pastoreo y la adición de nutrientes ($p=0.05$; Fig. 3.6, recuadro). De hecho, la fijación biológica de N fue estimulada por la fertilización sólo en parcelas pastoreadas (Fig. 3.6, recuadro).

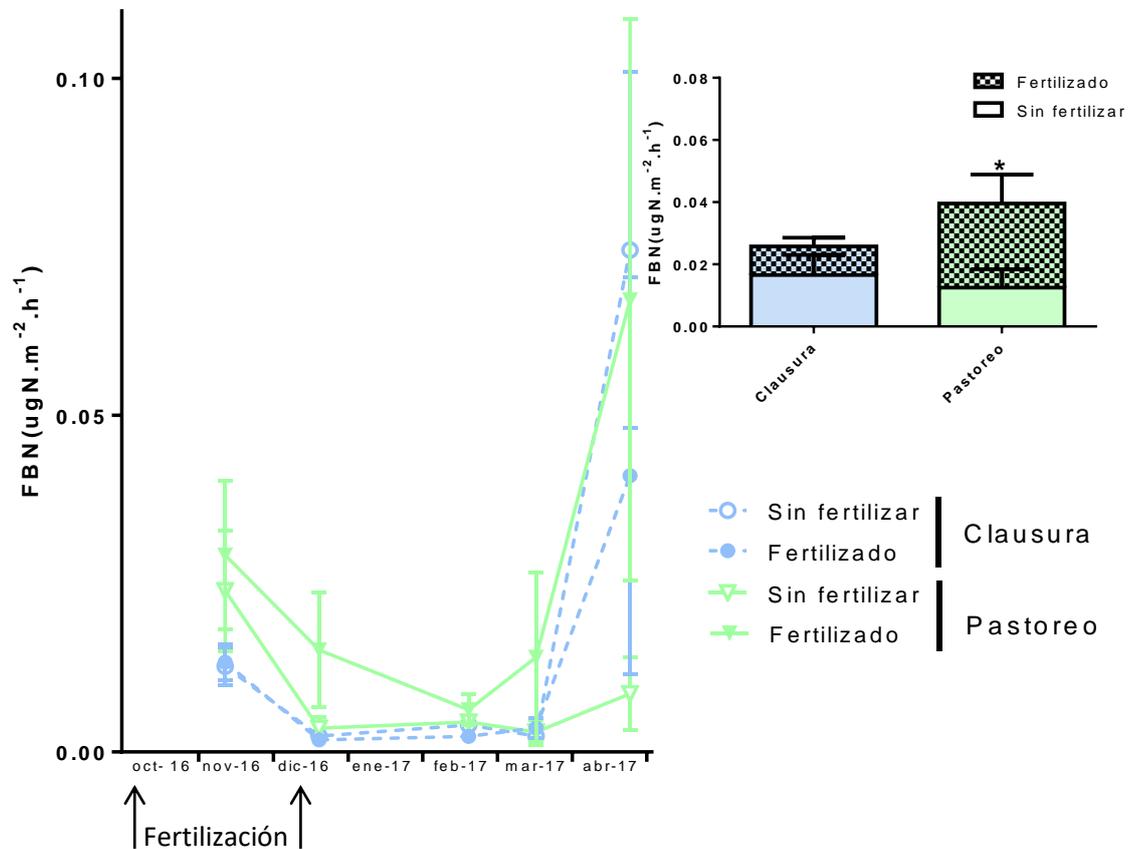


Figura 3.6. Fijación Biológica de Nitrógeno (BNF, $\mu\text{gN}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) en suelos de los pastizales pampeanos durante la época de crecimiento (octubre 2016 a abril 2017) en contexto de pastoreo y clausura, con y sin fertilización. Las barras representan la desviación estándar en cada punto. Figura del recuadro: BNF acumulado durante la temporada de crecimiento. El asterisco en el panel inserto de arriba muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las barras de error indican el error estándar.

Entre los impulsores proximales (Ecuación de resultado 3, $n=96$), la fijación de N se explicó por el contenido de agua del suelo y la concentración de amonio en el suelo. La humedad del suelo aumentó la fijación de N ($p=0.05$). Entre los impulsores distales (Ecuación de resultado 4, $n=96$), la relación C:N del suelo y PPNA explicaron la fijación de N, pero solo PPNA tuvo una correlación negativa significativa con la fijación de N ($p= 0.03$).

$$\log.FBN = -5.55 + 0.29*Humedad + 0.21*Amonio \quad (\text{Ec. resultado 3})$$

$$\log. FBN = -5.01 - 0.27* C:N - 0.35* PPNA \quad (\text{Ec. resultado 4})$$

3.3.3. Efectos de los tratamientos sobre otros atributos y procesos del ciclo del nitrógeno

La mineralización neta de N medida a campo durante la estación de crecimiento y en condiciones potenciales en el laboratorio no mostró diferencias entre los tratamientos (Fig. 3.7).

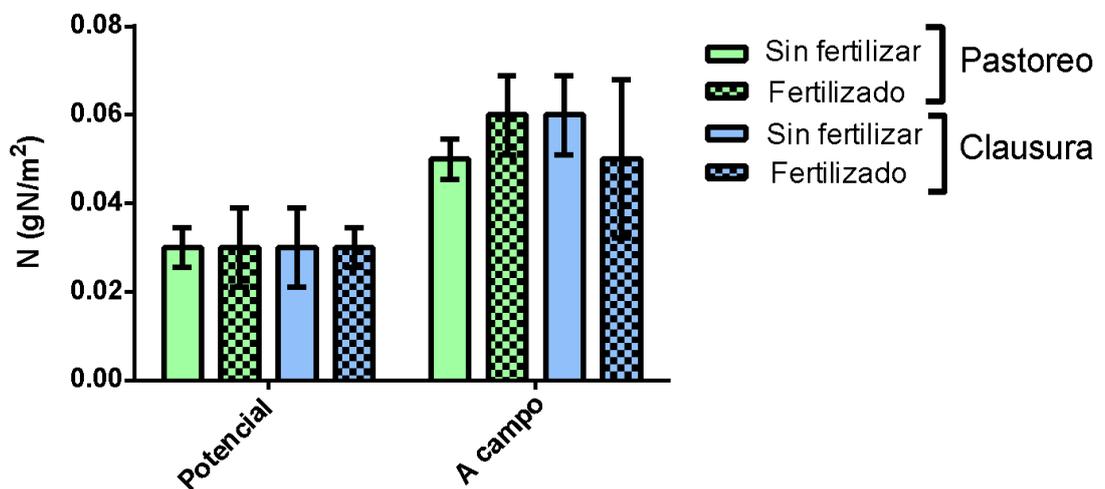


Figura 3.7. Mineralización neta de nitrógeno estimada en el laboratorio (panel izquierdo) y a campo (panel derecho). Las barras muestran valores medios ± 1 ES (n=6). No hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos en ninguno de los dos experimentos ($p > 0.05$).

Tampoco se encontraron efectos de la fertilización, el pastoreo o su combinación sobre los reservorios de nitrógeno del suelo medidos al final del experimento (marzo 2017; Cuadro 3.3). El nitrógeno en las fracciones de la materia orgánica particulada (N-MOP) y asociada a las arcillas (N-MOAM) fue similar entre los cuatro tratamientos, al

igual que el contenido de nitrógeno en la biomasa microbiana, estimado en el laboratorio con el método fumigación-extracción (Cuadro 3.3). El porcentaje de N total en el suelo al final del experimento (marzo 2017) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.2. Reservorios de nitrógeno del suelo medidos al final del experimento (marzo 2017) en muestras de suelo extraídas de los primeros 10 cm. Los valores muestran valores medios ± 1 ES (n=6). No hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

Variable	Clausura		Pastoreo	
	Sin fertilizar	Fertilizado	Sin fertilizar	Fertilizado
N-POM (gN/m²)	32.77 \pm 2.86	37.35 \pm 7.76	31.65 \pm 2.86	40.90 \pm 4.49
N-MOAM (gN/m²)	242.64 \pm 10.21	239.40 \pm 11.43	252.12 \pm 8.98	253.46 \pm 1.21
N-Biomasa Microbiana (mg/ha)	12.28 \pm 3.34	14.57 \pm 2.59	18.95 \pm 1.50	13.96 \pm 1.85
Nitrógeno total (%)	0.35 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	0.36 \pm 0.02

En cambio, los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre la tasa de respiración de suelo medida con el respirómetro en muestras de suelo llevadas al laboratorio. En este caso, se encontró que la fertilización con NPK estimuló significativamente ($p=0.037$) la tasa de respiración del suelo y no hubo interacción con el pastoreo (Fig.3.8).

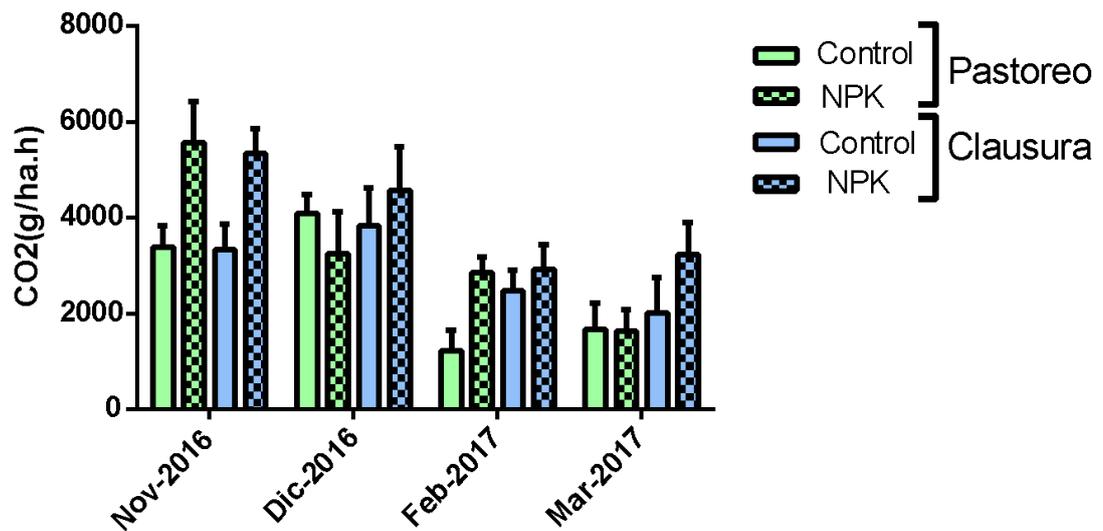


Figura 3.8. Tasa de respiración de suelo medida durante la estación de crecimiento noviembre-marzo. Las fechas de medición coinciden con los muestreos a campo de fijación biológica de N y emisiones de óxido nitroso. Se encontró un efecto significativo de la fertilización ($p=0.037$) en el modelo que incluyó todas las fechas. El modelo especifica que la emisión de CO₂ depende de la herbivoría y la fertilización y su interacción, más el efecto del mes como efecto fijo, mientras que en el efecto aleatorio se especifica la estructura de anidamiento de los datos considerando que es un experimento de parcelas divididas ($CO_2.g.ha.h \sim Herbivoria * Fertilizacion + MES$, random = $\sim 1 | Bloque / Herbivoria / Fertilización$). Las barras muestran valores medios +1 ES (n=6).

3.4. Discusión

La adición de nutrientes aumentó las emisiones de N₂O, como se esperaba en respuesta a un aumento del sustrato de los procesos de desnitrificación y nitrificación. Sin embargo, contrariamente a la hipótesis planteada, la fijación de N aumentó en un contexto enriquecido en nutrientes en la condición pastoreada. Sorprendentemente, la presencia del ganado no aumentó las emisiones de N₂O ni la fijación de N en comparación con el pastizal clausurado hace 13 años. Los efectos en estos procesos no se vieron reflejados en otros atributos del ciclo de nitrógeno ya que ni la mineralización neta de N ni lo

acumulado en la biomasa microbiana o el suelo mostraron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, la tasa de respiración de suelo, que describe en rasgos muy generales la actividad microbiana cuando es medida en condiciones potenciales, se vio incrementada por la fertilización tanto en la condición pastoreada como en la clausura.

El aumento de la fijación biológica de nitrógeno de vida libre con fertilización con N, P y K en condiciones de pastoreo coincidió con el aumento de la biomasa y cobertura relativa de leguminosas en esas mismas condiciones (Ciavattini 2017). Las plantas leguminosas se caracterizan por su asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que indica que la fertilización nitrogenada y fosforada en condiciones de pastoreo estimula tanto la fijación de N simbiótica y como la de vida libre. En cambio, dentro de las clausuras, donde el total de biomasa de gramíneas en pie es muy alta y la cantidad de luz PAR que llega al suelo es muy baja respecto a las parcelas pastoreadas (Cuadro 3.2), no se encontró un cambio en la abundancia de leguminosas en respuesta a la fertilización (Ciavattini 2017). Es decir, contrariamente a lo documentado en otros pastizales, en la Pampa Deprimida el ganado favorece a las leguminosas, posiblemente porque es más fuerte el efecto de reducir la competencia con los pastos que el consumo directo selectivo (Ciavattini 2017). Además, la combinación de fertilizantes a base de N, P y K con el mayor consumo del ganado (Campana y Yahdjian 2021) acentúa aún más este efecto, seguramente porque las leguminosas se ven favorecidas con el agregado de fósforo (Tognetti et al. 2021). La mayor disponibilidad de luz en el suelo en las condiciones pastoreadas puede haber estimulado también a las bacterias fijadoras autótrofas (Cuadro 3.2). En este estudio, la fijación biológica de N aumentó con la adición de nutrientes cuando hubo pastoreo, es decir cuando se combina con la eliminación de biomasa por parte de los grandes herbívoros, lo que determina una mayor disponibilidad de luz. En los modelos que evaluaron los factores de control, se encontró que la PPNA, que inhibe la FBN, lo cual sugiere que aquellos factores favorables para la productividad de las plantas son desfavorables para las bacterias fijadoras de N del suelo. Sin embargo, la FBN correlacionó positivamente con la humedad y el amonio en el suelo, que también serían favorables para el desarrollo de las plantas, pero probablemente no en el rango que tenían en este experimento, que eran valores muy bajos (ver Cuadro 3.2).

Las emisiones de óxido nitroso se aceleraron sólo en el corto plazo en respuesta a la fertilización, mientras que no mostraron cambios por el pastoreo. La exclusión del ganado no indujo cambios importantes en el N en la biomasa microbiana ni en el nitrógeno total del suelo por lo que resulta razonable que no tenga efectos sobre la emisión de óxido nitroso. Sin embargo, se esperaba que la exclusión del ganado tuviera un efecto positivo en el contenido de N de la cobertura vegetal debido a un aumento en la abundancia de leguminosas, pero este patrón no fue evidente posiblemente debido al predominio de la especie invasora *Festuca alta* en las clausuras, que superó la abundancia de las leguminosas (Ciavattini 2017).

Las emisiones de óxido nitroso fueron muy variables durante el período estudiado y su incremento por la adición de nutrientes fue marginal cuando se considera la emisión promedio durante toda la estación de crecimiento. Al comparar con otros pastizales de la región pampeana, se encontró que los valores reportados aquí están en el mismo rango que los de pastizales de la Pampa Ondulada o la Pampa Interior (Della Chiesa et al., 2019), pero mucho más bajas que los cultivos. De hecho, en los pastizales pampeanos Della Chiesa y colaboradores (2019) encontraron que las emisiones de N₂O representan el 21-31% de las emisiones de los cultivos. Por otro lado, las emisiones en cultivos como soja, maíz y trigo fueron mucho más variables que las de los pastizales (Della Chiesa et al. 2019).

La exclusión del pastoreo no cambió la emisión de N₂O durante la temporada de crecimiento, a pesar de que produjo cambios marcados en la composición de la vegetación (Campana 2021). La falta de pastoreo cambió la dominancia del pastizal, beneficiando a la *Festuca alta* (*Schenodorus arundinaceae*), una especie exótica invasora, y reduciendo la estabilidad (Campana et al. 2022). Sin embargo, la identidad y la mayor biomasa vegetal presente en parcelas clausuradas no alteraron los flujos de N₂O. Se esperaba que la exclusión del pastoreo redujera la variabilidad de las emisiones de N₂O y efectivamente se encontró una tendencia en ese sentido (menor variabilidad en los errores estándar en las emisiones de N₂O en las clausuras que en el pastoreo, Fig. 3.5), pero al analizar los coeficientes de variación no se encontraron diferencias significativas.

Las emisiones de N_2O son muy variables en el tiempo y el espacio y se han propuesto modelos para explicar su comportamiento (Del Grosso et al. 2006). Podría haber un impacto en la emisión de N_2O de todo el año, pero en este trabajo sólo se evaluaron las emisiones durante la estación de crecimiento. Durante los meses de invierno, las emisiones son bajas (Perez et al. 2021), pero en este sitio de estudio podría ser que la exclusión del pastoreo y las inundaciones afecten las emisiones de N_2O durante los meses de invierno cuando el pastizal suele estar inundado. Otros estudios mostraron que durante la inundación, la falta de oxígeno redujo la emisión potencial de N_2O posiblemente porque la desnitrificación fue completa y se emitió nitrógeno gaseoso, pero cuando el agua comienza a desaparecer, los flujos de N_2O alcanzan su punto máximo (Cai et al. 1997). La pérdida de N del suelo después de la inundación podría ser mayor, reduciendo la tasa potencial de desnitrificación de N y, por lo tanto, las emisiones de N_2O (Terry et al. 1981). El efecto de la exclusión del ganado sobre las emisiones de N_2O fue tan variable que para sacar conclusiones consistentes se requeriría una mayor cantidad de repeticiones y realizar mediciones durante todo el año.

Se esperaba que la fertilización aumentara las emisiones de N_2O debido al aumento del N reactivo para la desnitrificación. Sin embargo, este efecto sólo ocurrió en el corto plazo (dentro de los 40 días posteriores a la aplicación), donde hubo un aumento significativo en las emisiones de N_2O , como se discutió más arriba. Los impulsores proximales de las emisiones de óxido nitroso explicaron parcialmente el efecto que tuvo la fertilización en el corto plazo. De hecho, la temperatura del suelo estimuló las emisiones de N_2O . Curiosamente, la variación de la temperatura del suelo dependió de la exclusión del pastoreo. Las temperaturas del suelo más altas se registraron en las parcelas bajo pastoreo con adición de nutrientes en comparación con las parcelas sin fertilizar, posiblemente debido a la menor biomasa acumulada (Campana 2021), y las temperaturas del suelo fueron más bajas dentro de las clausuras donde se registró la mayor biomasa de plantas. Los impulsores distales del N_2O que mostraron un efecto significativo en las emisiones fueron el NBM y la PPNA. Se observó un aumento en las emisiones de N_2O con mayor PPNA, patrón consistente con lo reportado en estudios previos en la región pampeana (Piñeiro-Guerra et al. 2019). Esta respuesta posiblemente se explique porque

las emisiones N_2O y la PPNA tienen factores de control similares; por ejemplo, ambas aumentan con una mayor precipitación y temperatura anuales y con un mayor contenido de N en el suelo (Groffman et al. 2000; Piñeiro-Guerra et al. 2019).

Si bien es llamativo que los reservorios de nitrógeno en el suelo permanecieron relativamente sin cambios en respuesta a la fertilización y a exclusión del ganado, en la red *Nutrient Network* a la que pertenece este experimento, Sitters et al. (2020) también encontraron que la exclusión de herbívoros no tuvo impacto en las reservas de N del suelo en pastizales no fertilizados (Sitters et al. 2020). En cambio, en pastizales fertilizados sí encontraron una disminución general del N del suelo (NOS) en tratamientos sin pastoreo. En el sitio experimental de esta tesis, no se encontraron cambios en el NOS en ninguna de sus fracciones, MOP o MOAM, ni en la biomasa microbiana. El contenido de amonio del suelo aumentó con la exclusión del ganado (Cuadro 3.2), pero no la tasa de mineralización neta de N, lo que podría significar que este stock creció debido a la reducción de la volatilización de amonio. En cambio, las pérdidas por desnitrificación podrían haberse reducido con la ausencia de orina y heces de los animales (Luo et al., 2008), pero en este estudio ese efecto no fue significativo. Como consecuencia, los cambios en las entradas y salidas del sistema se compensaron y, por lo tanto, el N en el ecosistema no cambió, sino que se reubicó en la biomasa vegetal, el amonio en el suelo y la biomasa microbiana (ver detalle del balance de N en el capítulo 5).

La adición de nutrientes en los pastizales de pastoreados de la Pampa Deprimida incrementó el N en el sistema posiblemente por el aumento de la fijación biológica, además de la fertilización propiamente dicha. De hecho, analizando toda la estación de crecimiento, las emisiones de óxido nitroso no cambiaron en respuesta a la fertilización en las parcelas bajo pastoreo. Sólo aumentaron temporariamente los días después de la aplicación del fertilizante. Este resultado difiere al considerar las clausuras, probablemente debido a los efectos de compensación hipotetizados entre la exclusión del pastoreo y la fertilización. Por otro lado, la fijación biológica de N aumentó significativamente sólo en el pastizal pastoreado. En esta condición, el N se almacenó en la biomasa vegetal aérea y en la broza (Campana y Yahdjian 2021), tal como se esperaba,

porque las plantas en estos pastizales tienen limitaciones de N y P (Rodríguez et al. 2007; Semmartin et al. 2007). Sin embargo, no se encontró un aumento en el N en la biomasa microbiana, sólo un aumento de N en formas inorgánicas en el suelo. Sorprendentemente, el N en la biomasa microbiana no se modificó significativamente, pese a que se esperaba que los microbios del suelo tuvieran limitaciones de nutrientes como las plantas. Sin embargo, el agregado de nutrientes aumentó la respiración del suelo lo que sugiere que los microbios tienen limitaciones de C o nutrientes en el suelo (Treseder 2008).

Sin embargo, el esfuerzo por estudiar todo el ciclo reveló cambios muy pequeños pero significativos que tienen lugar (ver Capítulo 5). Las clausuras al pastoreo alteraron los impulsores distales de ambos procesos de N como son la PPNA, la biomasa vegetal aérea, la luz PAR recibida a nivel suelo y la relación C:N del suelo (Figura B4). Predecir los efectos antropogénicos en el funcionamiento de los ecosistemas (y los servicios de los ecosistemas relacionados) no es sencillo, ya que la interacción entre los impulsores y los efectos a corto y largo plazo impiden una generalización de los resultados. Las variaciones temporales y las compensaciones entre los factores e incluso entre las funciones demostraron ser más cruciales que los efectos principales esperados en los flujos de N estudiados.

En conjunto, los resultados volcados en este capítulo muestran que el agregado de nutrientes modifica significativamente procesos microbianos de entrada y salida de nitrógeno de los pastizales, con efectos dependientes del pastoreo en el caso de la fijación biológica de N. En cambio, el pastoreo por sí solo no modifica ninguno de los procesos del suelo estudiados. Esta mayor sensibilidad hacia el agregado de nutrientes que al pastoreo coinciden con los cambios en las comunidades microbianas del suelo descritos en el capítulo 2 y sugiere que podría haber alguna relación entre ellos.

CAPÍTULO 4: Multifuncionalidad de los ecosistemas: más que la suma de sus partes

4.1. Introducción

La multifuncionalidad (MF) de los ecosistemas se ha convertido en un concepto muy popular en los últimos años con el objetivo de ser una herramienta de manejo capaz de conectar múltiples procesos ecosistémicos con opciones de manejo y promover la sustentabilidad de los sistemas productivos. La popularidad del término surge de la posibilidad y la voluntad de estudiar holísticamente los ecosistemas naturales y modificados con el fin de entenderlos cabalmente, describirlos a través de un parámetro sencillo que englobe los principales procesos, y comparar y monitorear el estado de los ecosistemas. Sin embargo, en la práctica, la MF ha demostrado ser un término vagamente definido y su teoría y aplicación han resultado a veces en la unión de análisis y patrones estadísticos dispares sin mucho anclaje en los servicios ecosistémicos.

En las últimas décadas ha habido una creciente disponibilidad de datos en tiempo y espacio a la vez que se fue adquiriendo mayor conciencia de la complejidad de los ecosistemas y la dificultad para manejarlos de forma sustentable. En el afán de comprender y diseñar estrategias de manejo holísticas, surgen los índices de MF que pretenden reducir a un sólo valor múltiples funciones del ecosistema con el riesgo de simplificar inapropiadamente. La propuesta es tentadora, novedosa y tiene un gran potencial de aplicación, lo cual se refleja en el aumento exponencial de publicaciones científicas que utilizan el término multifuncionalidad desde el 2005 hasta la actualidad (Fig. 4.1.a). Las áreas temáticas en las que se utiliza el término son muy diversas, incluyendo desde las ciencias ambientales, biológicas y agrícolas hasta las ciencias sociales (Fig. 4.1.b). Además, las publicaciones estuvieron concentradas en revistas de alto impacto, que en el caso de las publicaciones en ciencias biológicas incluyeron principalmente las revistas *Land Use Policy*, *Science of The Total Environment*, *Ecological Indicators*, *Landscape and Urban Planning*, *Journal of Cleaner Production*, *Journal of Environmental Management*, *Urban Forestry & Urban Greening*, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *Forest Policy and Economics* y *Forest Ecology and Management*. Es destacable la cantidad de estudios de MF de ecosistemas en temáticas de ordenamiento territorial, lo cual está en línea con la necesidad global de manejar y conservar los ecosistemas con el fin de aumentar la contribución de la naturaleza a las

personas, como se destaca en el último informe del Panel Intergubernamental para el estudio de la Biodiversidad y los Servicios de los Ecosistemas (Díaz et al. 2019).

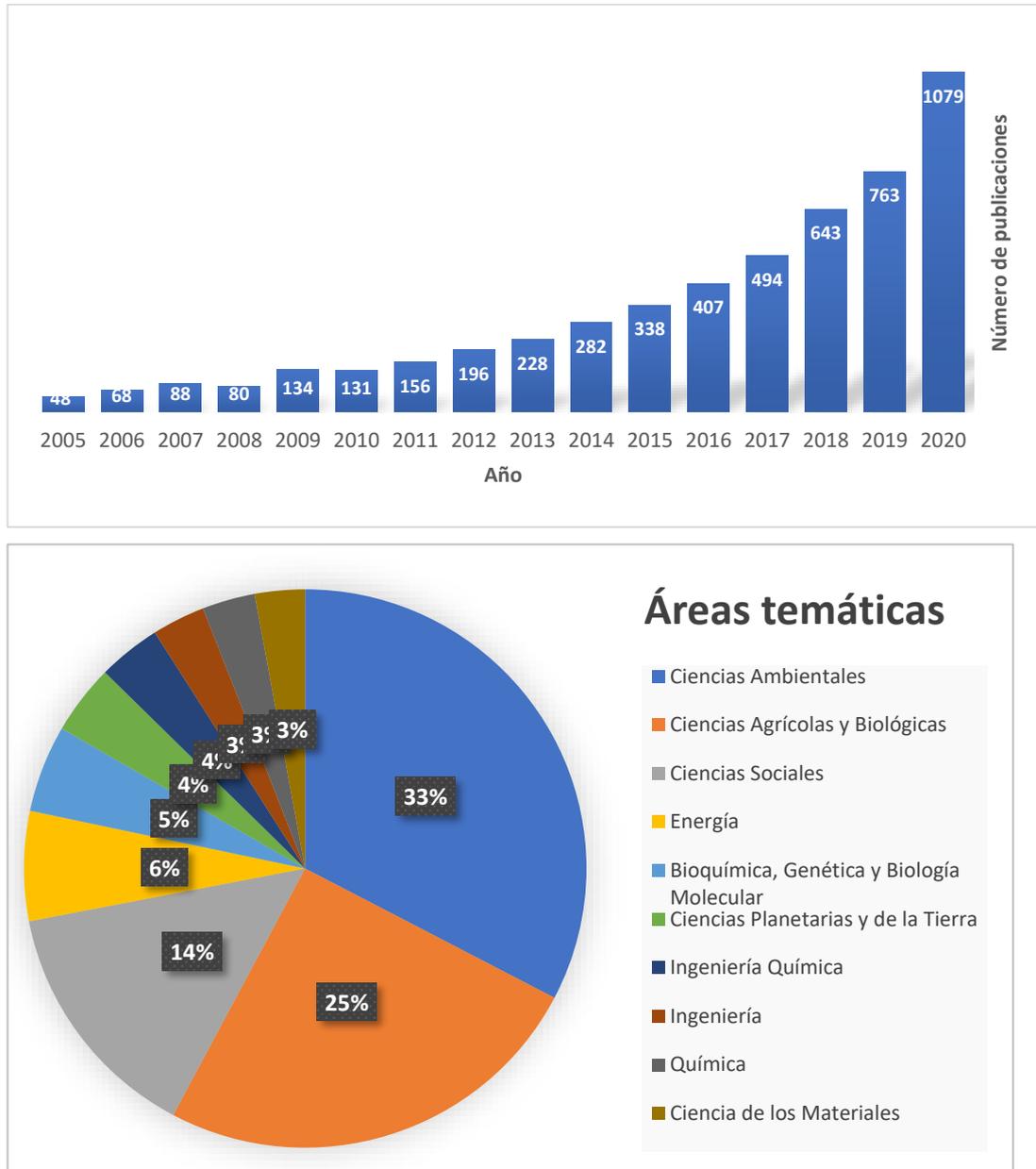


Figura 4.1. Publicaciones relacionadas con el tema multifuncionalidad en los últimos 15 años (base de datos Scopus). a) Cantidad de publicaciones en revistas indexadas. b) Porcentaje de publicaciones por área temática.

En este trabajo se propone que los índices de multifuncionalidad podrían considerar de mejor manera conjuntos de funciones y atributos ecosistémicos

predeterminados para evitar sumar información y datos que son poco relevantes y con criterios variables. Además, los índices de multifuncionalidad pueden estar mucho más conectados con los beneficios que las personas obtienen de la naturaleza, de tal manera que pueden ser directamente interpretables y usados como herramientas de manejo. Para que los índices se conviertan efectivamente en herramientas de manejo deben reflejar servicios ecosistémicos (también conocidos como beneficios de la naturaleza a las personas), pero estos son muy difíciles de medir. En el marco conceptual aquí descrito se propone que los servicios ecosistémicos de soporte pueden servir como término medio entre las funciones ecosistémicas y los servicios para mejorar los índices de multifuncionalidad. Las funciones y atributos ecosistémicos podrían agruparse en 4 servicios de soporte igualmente importantes: calidad de suelo, ciclado del agua, producción de plantas y biodiversidad, como se desarrolla más abajo. En este trabajo además de desarrollar un nuevo índice de MF, se utilizará un caso de estudio, el experimento factorial de Las Chilcas, sitio de estudio de esta tesis doctoral, para demostrar la aplicabilidad del nuevo desarrollo.

4.2 Método

4.2.1 Índices de multifuncionalidad

La definición más popular de la MF establece que se trata de “múltiples funciones ocurriendo en el mismo lugar y al mismo tiempo”. Esta definición es muy vaga y no permite saber a priori qué funciones y qué cálculos habría que tener en cuenta para estimarla a través de índices de MF. De esta forma, interpretar y comparar índices de MF no es sencillo y muchas veces no es posible. Por empezar, se debería contar con definiciones de las funciones o atributos del ecosistema, que pueden ser variables de estado o tasas de diversos procesos ecosistémicos. Las variables de estado pueden representar mejor grandes escalas espaciales, pero suelen ser poco sensibles a los cambios, mientras que las tasas de los procesos son más variables, tanto en el tiempo como en el espacio, y sirven mejor para captar cambios a corto plazo.

En cuanto a las distintas formas de cálculo de los índices de MF, se usan principalmente los siguientes métodos: 1) estandarización (SD), que consiste en hacer el promedio de las distintas funciones ya estandarizadas con promedio 0 y desvío estándar igual a 1; 2) promedio de las funciones estandarizadas usando el máximo observado (M); y 3) múltiples umbrales (U), donde cada función estandarizada es sumada en el índice sólo si supera un umbral determinado (se pueden usar umbrales definidos o hacer de 0 a 100%) (Cuadro 4.1). Usando el mismo set de datos, la mayoría de las veces las distintas formas de cálculo arrojan resultados y conclusiones distintas (ver más adelante en este trabajo el desarrollo de un ejemplo concreto para mostrar estas diferencias con un caso de estudio). Por otra parte, los cálculos de los índices de MF no son objetivos, no pretenden serlo, ya que la estandarización depende de qué valores de cada función se consideran como máximos y mínimos. Por ejemplo, fijar un porcentaje umbral implica una apreciación subjetiva. Asimismo, la diversidad de formas de medición no tiene en cuenta la variabilidad temporal de las funciones medidas. Dependiendo del objetivo para el cual se mide la MF, deberían tenerse en cuenta la variabilidad temporal de las funciones y su impacto en los servicios ecosistémicos.

Cuadro 4.1. Análisis bibliográfico de las formas más usadas para calcular índices de multifuncionalidad y las funciones ecosistémicas consideradas.

Índice de multifuncionalidad	Funciones o atributos ecosistémicos incluidos	Publicación científica de referencia
Índice basado en el desvío estándar (SD) Promedio del rendimiento de las funciones ecosistémicas consideradas luego de estandarizarlas con promedio 0 y desvío 1, tal que todas las funciones pesan igual en el cálculo del promedio.	4 funciones (tasas de procesos): descomposición de algodón, descomposición de broza, productividad de plantas y contenido de nitrógeno en la biomasa aérea.	(Mouillot et al. 2011)
	14 funciones (variables de estado de suelo), contenido de: carbono orgánico, β -glucosidasa, pentosa, hexosa, compuestos aromáticos, nitrógeno total, nitrógeno de amonio y nitrato, aminoácidos, proteínas, potencial de transformación del nitrógeno, fósforo disponible inorgánico y fosfatasa.	(Maestre et al. 2012)
	10 funciones (variables de estado de suelo): contenido de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo y potasio disponibles, agua a capacidad de campo, estabilidad de los	(Peco et al. 2017)

	agregados, carbono de suelo orgánico, humedad de suelo y resistencia a la penetración del suelo.	
Índice basado en los máximos (M) Promedio de todas las funciones ecosistémicas consideradas luego de estandarizarlas usando el máximo observado en el sitio para cada variable.	8 funciones (mezcla de tasas de procesos y variables de estado): biomasa aérea viva, interceptación de luz, contenido total de N del suelo y de fósforo y potasio extraíbles, contenido de carbono del suelo, descomposición de la broza y resistencia a la invasión de la comunidad vegetal.	(Hautier et al. 2018)
Índice basado en múltiples umbrales (U) Suma de la cantidad de funciones que superaron determinado umbral. El umbral ser fijo o se puede usar todo el rango de 0 a 99% (se estandariza utilizando el máximo del sitio).	8 funciones (mezcla de tasas de procesos y variables de estado): Resistencia a la invasión (100% menos el porcentaje de cobertura de la especie invasora), productividad primaria neta aérea, biomasa subterránea (0–30 cm), eficiencia del uso del nitrógeno del suelo (NO ₂ +NO ₃ , 0-20 cm), riqueza y abundancia de insectos, C del suelo C (0–20 cm), y N en plantas.	(Zavaleta et al. 2010)
	6 variables (mezcla de tasas de procesos y variables de estado): mineralización potencial del nitrógeno del suelo, contenido de nitrato y amonio del suelo, concentración de DNA de suelo, contenido de P disponible del suelo y productividad de plantas.	(Delgado-Baquerizo et al. 2016)

En cuanto a las funciones elegidas para conformar el índice, la subjetividad es evidente. Muchos de los trabajos de MF eligen medir procesos que no son tales, que son propiedades de los sistemas (Garland et al. 2021), mientras que muchos otros usan los servicios de soporte, tal como se propone en este trabajo, pero sin hacerlo explícito (por ejemplo, Birkhofer et al. 2018, y Blesh 2018 y muchos de los trabajos citados en la Cuadro 4.1). Usar los servicios intermedios de forma explícita permite una mejor interpretación del índice, pero debe combinarse con lineamientos claros de qué funciones elegir para generar conclusiones válidas respecto a la MF del ecosistema. Los resultados a los que se arriba teniendo en cuenta distintas funciones ecosistémicas lógicamente son diferentes.

Por último, la cantidad de funciones consideradas también es debatible y altera el resultado, en especial porque todas las funciones tienen el mismo peso en los métodos de

cálculo analizados. En este caso, tener más mediciones de funciones distintas no es necesariamente mejor. Por ejemplo, tener muchas mediciones para caracterizar la estabilidad o fertilidad del suelo y pocas de biodiversidad puede sesgar el índice de MF. En cuanto al ejercicio matemático de considerar distinta cantidad de funciones al azar, se puede ver en el caso de estudio descrito más adelante que disminuir la cantidad de funciones a 75% y 50% cambia no sólo el valor del índice, sino también las conclusiones que pueden interpretarse de los mismos (Figura C1 y C2). Los distintos métodos de cálculo tienen una sensibilidad distinta a los cambios en la cantidad de funciones consideradas, pero aun así es preocupante pensar en una herramienta de manejo que puede variar tan amplia y sesgadamente.

4.2.2 Un marco conceptual renovado para los índices de MF: los servicios de soporte

La utilización de los servicios de soporte como término medio entre las funciones y los servicios ecosistémicos puede ofrecer un marco conceptual renovado para los índices de MF ya que puede volverlos más apropiados para ser herramientas de manejo, como se muestra a continuación. Los servicios de soporte o apoyo se refieren a procesos ecológicos necesarios para la provisión y existencia de los demás servicios ecosistémicos (MA 2005). Proponemos 4 servicios de soporte igualmente importantes, interconectados, y fáciles de definir y comunicar:

- ✓ Ciclado del agua: funciones que representan la disponibilidad de agua para los autótrofos, principalmente, la regulación del clima y la purificación del agua.
- ✓ Producción de plantas: funciones que representan la entrada de energía al sistema a través de la fotosíntesis, que en general es llevada a cabo por las plantas, excepto en sistemas áridos donde las costras biológicas del suelo pueden ser importantes productores primarios, o en sistemas acuáticos. En este estudio se referirá a este ingreso de energía como la producción de plantas para simplificar el lenguaje y facilitar la comprensión del concepto.

- ✓ Salud del suelo: no como propiedad del sistema, sino como funciones que representen el ciclado de nutrientes (C, N, P, S, etc.) en el suelo y la actividad microbiana en el mismo.
- ✓ Biodiversidad: si bien no es considerada un servicio de soporte según la MEA (2005) que le da un rol superior como de “sombrija” por sobre todos los servicios, resulta útil para el cálculo del índice de MF porque está directamente relacionada con los servicios y con las demás funciones ecosistémicas, tal como sucede con los otros servicios de soporte. Además, medir la biodiversidad e incluirla en el índice es reconocer su importancia en el funcionamiento de los ecosistemas.

Estos servicios de soporte numerados más arriba también constituyen índices per se que se promedian para generar el índice de MF general. El servicio de soporte de formación de suelo no se incluyó en la lista porque es un proceso que ocurre en tiempos geológicos.

Los 4 servicios de soporte están directamente conectados con los servicios de los ecosistemas finales de provisión, regulación y culturales (Figura 4.2). El ciclado del agua está conectado con la provisión de agua potable, la producción de alimentos, la producción de madera y fibra, pero también con la regulación de clima, la purificación del agua y los servicios culturales recreativos, como los deportes acuáticos y el turismo. Por otra parte, la producción de plantas está relacionada con la producción de alimentos vegetales y animales, a la vez que permite la regulación del clima y da belleza a los sistemas naturales y artificiales en tanto servicio cultural. La salud del suelo permite los servicios de provisión, a la vez que regula las inundaciones. Finalmente, la biodiversidad está involucrada en la provisión de todos los servicios finales (Fig. 4.2).

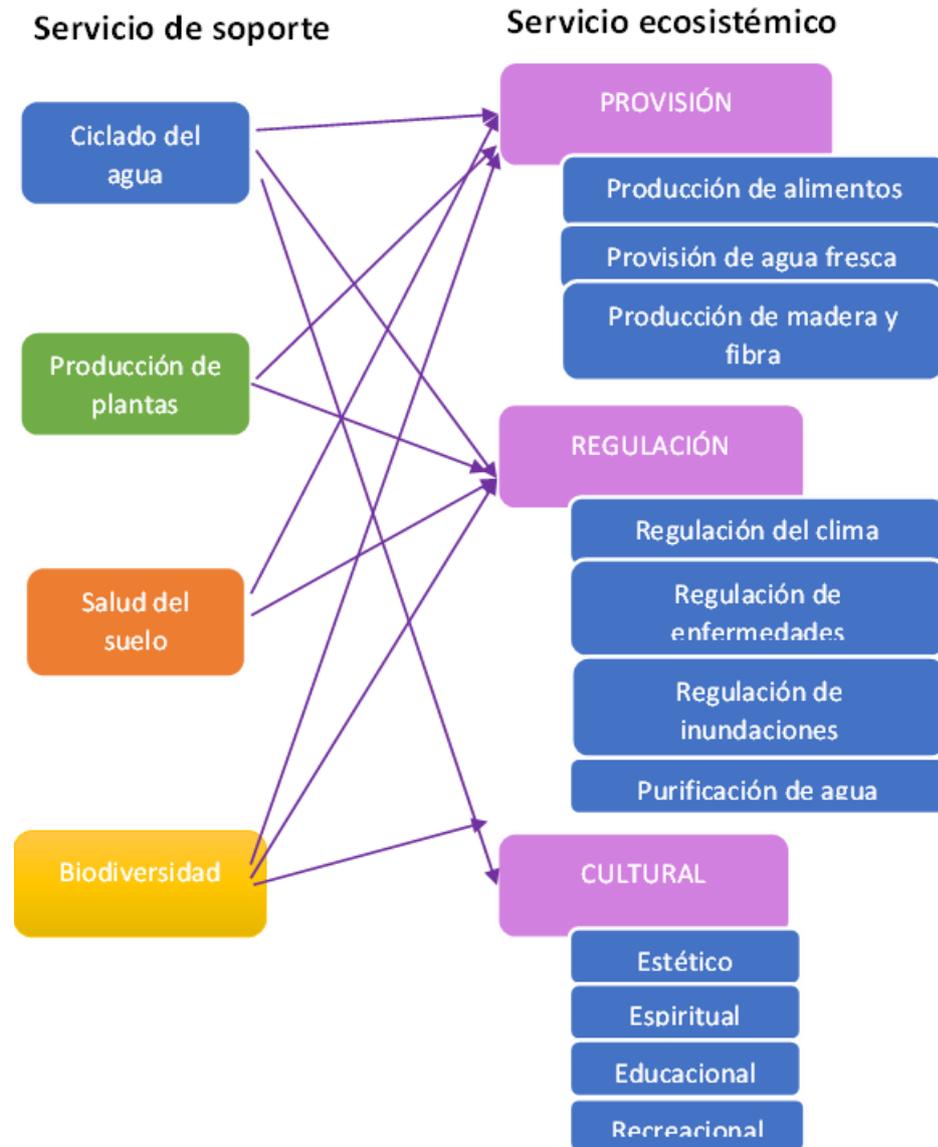


Figura 4.2. Conexión de los servicios ecosistémicos de soporte con los demás servicios de los ecosistemas.

Los servicios de soporte no son independientes, por el contrario, están interrelacionados (Figura 4.3) y eso hace posible que haya relaciones sinérgicas entre ellos. Así como la mejora en alguno de los servicios podría beneficiar a todo el resto, lo contrario también es cierto, perjudicar a uno podría dañar a todos. Estas relaciones son difíciles de medir, pero pueden incluirse fácilmente en el índice. Es claro que debe haber

un umbral para cada servicio por debajo del cual el sistema entero no es sustentable por más que el resto de los servicios de soporte tengan valores razonables.

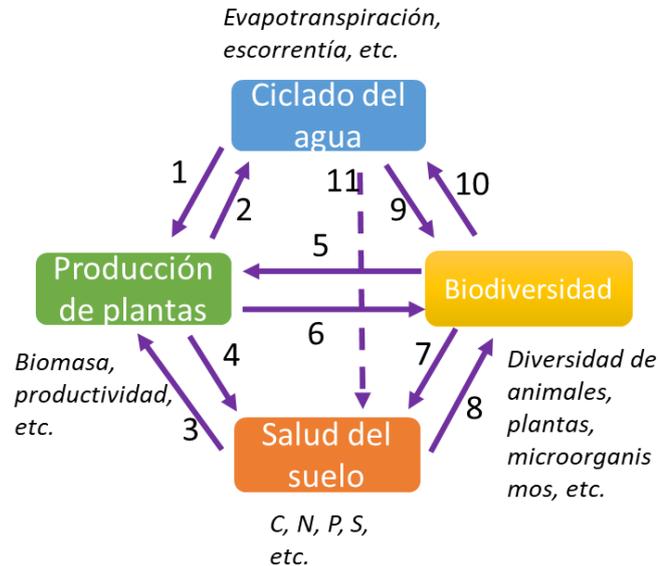


Figura 4.3. Interconexión entre los servicios de soporte. La relación entre los servicios de soporte tiene que ver con 1) el agua disponible para la producción de plantas, 2) la absorción de agua de las plantas y la transpiración, 3) la calidad del suelo que determina la productividad de las plantas, 4) la calidad de la broza que determina la materia orgánica del suelo, 5) la diversidad de plantas y herbívoros puede cambiar la producción de biomasa vegetal, 6) la producción primaria neta es la fuente de energía para sostener la biodiversidad 7) la fauna y los microorganismos del suelo pueden aumentar la materia orgánica y el contenido de N del suelo, 8) la calidad del suelo condiciona el hábitat y los recursos disponibles para los microorganismos del suelo, 9) el agua disponible determina la biodiversidad, 10) el agua contenida en la biomasa viva y su liberación por heces y muerte, y 11) la erosión del suelo por precipitación y el lixiviado de nutrientes.

4.1.4. Sistema de contingencias para elegir las funciones del índice de MF

No hay un conjunto pequeño de funciones que sirvan para describir la funcionalidad de todos los ecosistemas terrestres, por lo que se propone una serie de criterios claros para la elección de cada función dentro de cada servicio de soporte. Para evaluar las funciones a elegir, primero hay que definir los objetivos para los cuales se quiere medir la multifuncionalidad. No es lo mismo estimar la MF para mejorar la producción de forraje de una pradera, que medir la MF de un desierto para evaluar el impacto de la introducción del ganado o del cambio climático. Cada objetivo tiene una

sensibilidad diferente y una escala temporal y espacial particular, que es el siguiente punto a tener en cuenta. Hay funciones que pueden ser más o menos variables en el tiempo y es importante considerar el objetivo a la hora de elegir las. Además, el diseño para la toma de muestras y mediciones necesita ser acorde a la escala. Las funciones entendidas en el contexto de los índices de multifuncionalidad pueden ser variables de estados o tasas de diversos procesos ecosistémicos. Los estados pueden representar mejor grandes escalas espaciales, pero suelen ser poco sensibles a los cambios, mientras que las tasas son más variables tanto en el tiempo como en el espacio y sirven mejor para captar cambios a corto plazo. Asimismo, es fundamental saber qué datos y qué equipamiento hay disponible ya que lo ideal sería aprovechar las medidas in situ y evitar las estimaciones. La practicidad del índice depende de que sea fácil de medir, por lo que sería conveniente elegir alrededor de 12 funciones como máximo. Por último, el punto más importante es conocer el sistema en el cual se está trabajando para poder elegir las funciones más relevantes (Cuadro 4.2). Además, cada función ecosistémica puede ser estimada con un indicador en particular, como puede verse en el Cuadro 4.2 que debe elegirse con los mismos criterios con los que se eligen las funciones. Un indicador es una metodología precisa para estimar una función ecosistémica.

En resumen, para elegir las funciones a incluir dentro del índice de MF hay que:

- ✓ Definir los objetivos.
- ✓ Definir la escala temporal y espacial.
- ✓ Adaptarse a los datos y equipamiento disponibles.
- ✓ Conocer el sistema de estudio.

Cuadro 4.2. Indicadores posibles de las distintas funciones ecosistémicas incluidas en los servicios de soporte.

Servicio de soporte	Funciones ecosistémicas	Indicador
Ciclado del agua <i>(agua disponible para los autótrofos)</i>	Humedad del suelo	Humedad gravimétrica o TDR (%)

		Humedad del suelo a capacidad de campo
	Precipitación	Precipitación media anual (mm/año)
	Verdor de la vegetación	NDVI
Producción de plantas <i>(Provisión de energía para el sistema, principalmente por acción de los autótrofos)</i>	Biomasa verde	Biomasa verde (gr/m ²)
	Productividad	NDVI
	Actividad fotosintética de costras biológicas	Tasa de transporte electrónico ($\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Salud del suelo <i>(Ciclado de C, N, P y otros nutrientes limitantes para el sistema estudiado, así como la actividad de la micro y macrofauna del suelo)</i>	Contenido de materia orgánica del suelo	Materia orgánica (kg/ha)
	Contenido de carbono en la materia orgánica del suelo	C orgánico (kg/ha)
	Relación C:N en el suelo	C:N
	Contenido de N en el suelo	N total (kg/ha), N inorgánico, N orgánico, N en fracciones MOP y MOAM de la materia orgánica
	Contenido de P disponible en el suelo	P Bray (ppm), P disponible
	Respiración de suelo	CO ₂ (ppm)
	Estabilidad del suelo	Índice de Estabilidad del suelo (dispersión, impacto de gota de lluvia, tamizado húmedo)
Biodiversidad <i>(Representación de la diversidad de plantas, animales o microorganismos, o especies indicadoras, ingenieras, claves, etc.)</i>	Diversidad (de especies o grupos funcionales de plantas, animales, peces, microorganismos, etc.)	Riqueza (número de especies, grupos funcionales) Índice de Shannon-Weiner
	Dominancia	Índice de Simpson
	Equitatividad	Índice de Pielou
	Presencia/cobertura de especie clave, invasora o indicadora	Porcentaje de cobertura (%)

4.2. Análisis de MF en un pastizal ganadero de la Pampa Deprimida

Los campos ganaderos basados en el pastizal natural en la Región Pampeana de la Argentina ofrecen una excelente oportunidad para estudiar la provisión de múltiples servicios de la naturaleza a la población humana. Dichos pastizales pueden producir carne vacuna a la vez que sostienen una gran biodiversidad de fauna y flora autóctonas que permiten secuestrar carbono del aire, purificar el agua, e incluso permiten actividades

recreativas y culturales. Sin embargo, diversos factores del cambio global, como ser el cambio de uso de la tierra y el uso de fertilizantes, amenazan con alterar la provisión de servicios de estos ecosistemas. Por ello en el experimento factorial descrito en el capítulo 1 en la estancia ganadera “Las Chilcas”, de 3000 ha de extensión, ubicada a aproximadamente 40 km al sur de Pila, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Fig. 1.2) se evaluó el efecto de la adición de múltiples nutrientes y del pastoreo en la multifuncionalidad (Fig. 1.3). El sitio es representativo de la comunidad mesofítica húmeda de la parte central de la Pampa Deprimida. La productividad primaria neta aérea promedio es $550 \text{ g.m}^{-2} \text{ año}^{-1}$, con un pico en primavera tardía. El diseño del experimento fue un factorial completo de fertilización y pastoreo combinados (4 tratamientos), en un total de 6 bloques (Fig. 1.3). Cada bloque tiene una clausura con 2 parcelas de 5 x 5m de los dos niveles de agregado de nutrientes: Control (sin fertilizar) y agregado de nitrógeno, fósforo y potasio (NPK). Por otra parte, hay 2 parcelas del mismo tamaño demarcadas fuera de cada clausura en cada bloque, que fueron pastoreadas (1 vaca/ha, que es el valor de carga animal representativo de la zona) en primavera y verano. Una de estas parcelas en pastoreo recibió también el tratamiento de agregado de nutrientes NPK y la otra se dejó sin fertilizar. La tasa de aplicación de nutrientes es alta para garantizar su disponibilidad para las plantas: $10 \text{ kg ha}^{-1}\text{año}^{-1}$ de cada nutriente. Todos los tratamientos de fertilización incluyen el agregado de micronutrientes al principio del experimento por única vez (ver diseño experimental detallado en el Capítulo 1).

Las cuatro condiciones del pastizal generadas experimentalmente se utilizaron como caso de estudio para evaluar el impacto de la fertilización y la introducción del pastoreo en la multifuncionalidad del pastizal a través de distintos índices (el índice basado en el desvío estándar (SD), el índice basado en los máximos (M)) y el índice de multifuncionalidad (MF) propuesto en este estudio con sus 4 subíndices (Figura 4.3). La comparación entre índices permitirá comprobar si dan resultados consistentes y evaluar la utilidad del nuevo índice propuesto en este trabajo. También se realizó un análisis de sensibilidad de los índices para determinar los cambios en los valores en función de la cantidad de funciones consideradas. Se redujo un 25% (de 18 a 13 funciones) y un 50%

(de 18 a 9) de las funciones, seleccionadas al azar, y se analizó el efecto de estas reducciones en los tres índices estudiados.

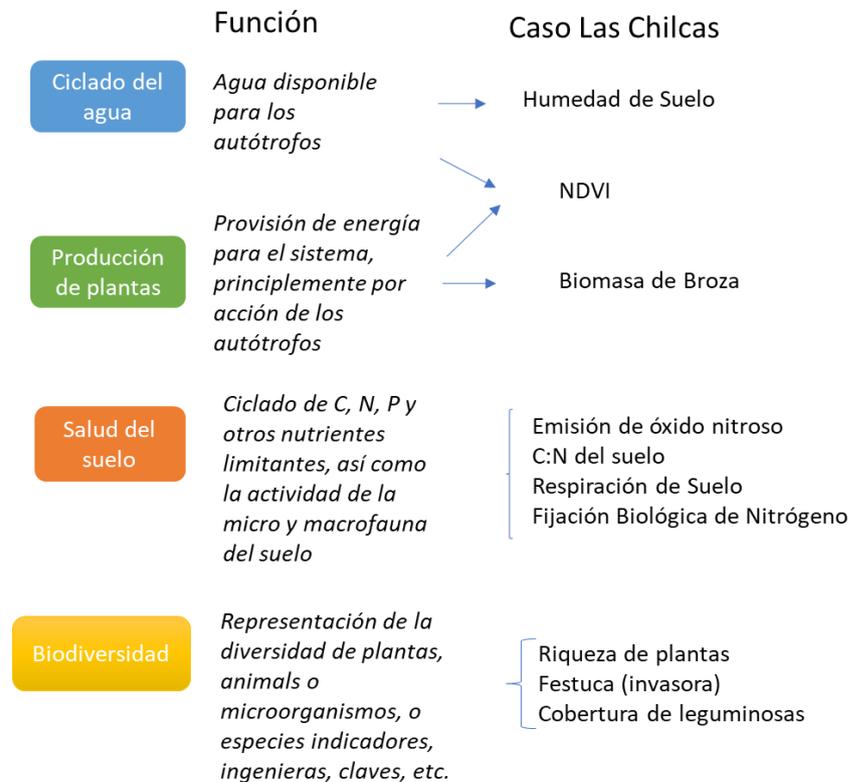


Figura 4.4. Servicios intermedios seleccionados para el caso de estudio del pastizal bajo uso ganadero en la Pampa Deprimida, establecimiento “Las Chilcas”, Pcia de Bs As.

El índice de MF propuesto considera las funciones ecosistémicas que pueden observarse en la derecha de la Figura 4.4. Las mismas fueron medidas en varios momentos del año o durante años consecutivos (ver capítulo 3 para un detalle metodológico de las mediciones realizadas). Todas las variables fueron estandarizadas según el promedio de los 7 valores más altos medidos en todo el sitio experimental. Luego, se promediaron las funciones que conformaban cada subíndice (producción de plantas, ciclado del agua, salud del suelo y biodiversidad). Finalmente, el promedio de los 4 subíndices dio por resultado el índice de MF global.

4.3. Resultados del caso de estudio: multifuncionalidad del pastizal de la Pampa Deprimida bajo uso ganadero en escenarios de enriquecimiento con nutrientes

Primeramente, se constató que distintos índices (SD, M y MF) dieron distinto resultado, en general (Cuadro 4.3). De hecho, considerando 18 funciones ecosistémicas medidas en el sitio de estudio en los cuatro tratamientos, con el método SD se concluye que el pastizal pastoreado y fertilizado es el que tiene mayor MF, mientras que con el método M no se observan diferencias entre pastizales, es decir la multifuncionalidad es independientemente de si están pastoreados y/o fertilizados (Cuadro 4.3). Los métodos de umbrales también mostraron diversidad de resultados a distintos umbrales complejizando la comprensión del mensaje del índice (Figura Suplementaria C2). En cuanto a considerar distinta cantidad de funciones al azar, se puede ver en el caso de estudio descripto nuevamente la inconsistencia de los índices al disminuir la cantidad de funciones al 75% (13 funciones) y 50% (9 funciones) cambia no sólo el valor del índice, sino también las conclusiones que pueden interpretarse de los mismos (Cuadro 4.3). Por ejemplo, con el índice SD usando 100% de las funciones se ve que el pastizal pastoreado es el más multifuncional, sin embargo, cuando se usan el 75% de las funciones no hay diferencias entre los pastizales, y cuando se considera el 50% se concluye que los pastizales fertilizados son los más multifuncionales.

En el Cuadro 4.3 se puede observar que según el índice MF propuesto en esta tesis, los lotes con ganado presentan mayor índice de MF, mientras que la fertilización tiene un efecto marginalmente positivo, pero definitivamente no reduce la MF. Esto significa que excluir las vacas de este sistema reduce significativamente la MF del pastizal, y al estudiar los subíndices podemos entender las causas de esta reducción. En cuanto a los componentes de la MF que se ven afectados por los tratamientos, la fertilización aumenta la producción de biomasa de plantas, mientras que el pastoreo mejora el ciclado del agua y aumenta la biodiversidad del sistema. El efecto positivo de la fertilización sobre la producción forrajera es de esperar cuando hay una limitación al crecimiento de las plantas por falta de nutrientes. Por otra parte, se observó que en este pastizal, el pastoreo limita la dominancia de *Festuca* alta, por lo que el efecto positivo del

pastoreo en la biodiversidad era esperable (Campana et al. 2022). Sin embargo, el efecto positivo del pastoreo sobre el ciclado del agua es novedoso. Las dos variables analizadas para determinar dicho componente del índice fueron la humedad gravimétrica del suelo y el NDVI. Ambas variables no muestran resultados contundentes cuando son analizadas por separado (Figura 4.5), pero combinadas muestran mayor disponibilidad de agua para los autótrofos en los lotes pastoreados. Esto puede deberse al que el pastoreo promueve el rebrote del pastizal y disminuye la cantidad de biomasa muerta en pie, aprovechando el agua disponible. De todos modos, la diferencia, si bien es significativa, es muy pequeña. En conclusión, en cuanto al manejo del pastizal este índice arroja recomendaciones interesantes: no excluir al ganado, puesto que controla a la especie invasora que rápidamente se vuelve dominante, Festuca alta, y considerar cuidadosamente la posibilidad de fertilizar el pastizal bajo uso ganadero para conseguir mayor producción de forraje, ya que no disminuye la MF del sistema.

Cuadro 4.3. Resumen de los índices tradicionales (SD basado en el desvío estándar, y M basado en los máximos, ver cálculos en Cuadro 4.1) y el nuevo índice de funcionalidad propuesto en este trabajo (MF, con los 4 subíndices relacionados a los servicios de soporte: planta, agua, suelo y biodiversidad). Los análisis con cada índice se realizaron para el total de 18 funciones y para dos casos de reducción en un 25 (13 funciones) y 50% (9 funciones) de las funciones consideradas en el cálculo del índice. Las letras diferentes indican diferencias significativas en el índice para los distintos tratamientos. Se marcó en rojo los valores máximos y en azul, los mínimos, comparando entre los tratamientos.

Índice	Número de variables	Valor del índice			
		Clausura control	Clausura con NPK	Pastoreo control	Pastoreo con NPK
SD	18	-0.15 (0.04) B	0.09 (0.05) B	-0.07 (0.04) B	0.14 (0.04) A
SD	13	-0.12 (0.01) A	0.12 (0.01) A	-0.12 (0.01) A	0.11 (0.01) A
SD	9	-0.18 (0.02) B	0.12 (0.04) A	-0.09 (0.03) B	0.15 (0.03) A
M	18	0.40 (0.01) A	0.46 (0.01) A	0.41 (0.01) A	0.47 (0.01) A
M	13	0.42 (0.002) A	0.47 (0.004) A	0.41 (0.01) A	0.47 (0.01) A
M	9	0.33 (0.004) B	0.40 (0.01) A	0.35 (0.01) B	0.41 (0.01) A
MF	10	0.597 (0.01) B	0.596 (0.02) B	0.626 (0.01) A	0.647 (0.01) A
MF planta	2	0.59 (0.01) B	0.62 (0.04) A	0.54 (0.02) B	0.62 (0.03) A
MF agua	2	0.70 (0.01) AB	0.69 (0.02) B	0.77 (0.01) A	0.77 (0.01) A
MF suelo	4	0.59 (0.01) A	0.63 (0.03) A	0.61 (0.02) A	0.58 (0.02) A

MF biodiv	3	0.50 (0.03) B	0.44 (0.04) B	0.59 (0.02) A	0.62 (0.03) A
-----------	---	---------------	---------------	---------------	---------------

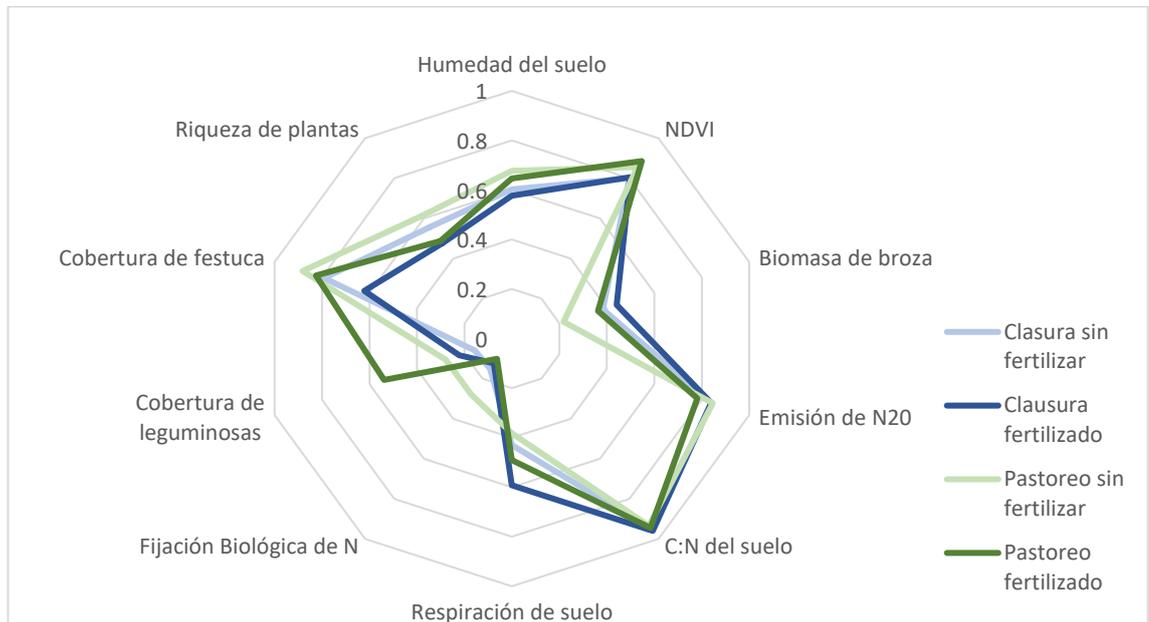


Figura 4.5. Gráfico de tela de araña representando las funciones ecosistémicas consideradas en el nuevo índice de multifuncionalidad propuesto (MF). Los valores de todas las variables fueron estandarizados.

4.5. Discusión y Conclusiones

La multifuncionalidad de los ecosistemas no es fácil de medir ya que varía ampliamente entre sistemas y a lo largo del tiempo. Esta complejidad no puede ser reflejada por un set de variables prefijadas que pueda aplicarse a todos los ecosistemas terrestres. Por esta razón el índice propuesto en este trabajo es un sistema para la elección de las mejores funciones para representar la multifuncionalidad y poder evaluar el impacto de disturbios según su escala temporal y espacial. Esta definición del índice en función de su aplicación lo hace más apropiado como herramienta de manejo, en contraste con la idea de que “más es mejor” y que tienta a los investigadores a juntar en un sólo número la mayor cantidad posible de información de un sistema. En el caso de estudio, se pudo demostrar que los índices tradicionales tienen un fuerte sesgo debido a la elección de funciones en identidad y cantidad, además de las diferencias debidas a la forma de cálculo. Sin embargo, el mayor problema de los índices de multifuncionalidad

tradicionales es la dificultad para interpretar los valores que arrojan ya que son en sí mismos poco informativos. Por el contrario, el índice propuesto en este estudio, al estar desglosado en 4 subíndices, permite visualizar fácilmente qué área está pesando dentro del índice general para que aumente o disminuya la multifuncionalidad del ecosistema, de tal forma que sea más fácil evaluar una medida de manejo del ecosistema.

La mayor dificultad que presentó el desarrollo del nuevo índice fue la imposibilidad de verificar si el resultado es el correcto porque los otros índices no son comparables y dieron resultados muy dispares. En el camino hacia generar un mejor indicador, en general, las versiones viejas y las nuevas tienden a apuntar a un mismo resultado mejorando la sensibilidad, la facilidad de cálculo o algún atributo secundario. Además, suele existir un valor real o un método de simulación con el cual evaluar la certeza de la estimación del nuevo índice. Tomando por ejemplo el caso del índice de vegetación NDVI, éste se desarrolló rápidamente y hoy está ampliamente adoptado en el mundo. Lamentablemente, con la multifuncionalidad no pasa lo mismo, aun no existe ningún contraste que nos permita evaluar si el índice sobre o subestima el valor real de la multifuncionalidad de los ecosistemas. Aun así, este trabajo hace un valioso aporte en cuanto a definir qué son las funciones ecosistémicas, la importancia de los servicios intermedios, y en definir cuatro áreas de multifuncionalidad que no pueden faltar si uno quiere representar un sistema holísticamente. Esto se puede ver muy claramente en el caso de estudio de Las Chilcas donde si uno se concentra, por ejemplo, en las comunidades de plantas en la estación de crecimiento, habría mucha evidencia para decir que los cambios en la biomasa de plantas y en la composición de estas debido al pastoreo y la fertilización deberían impactar en el funcionamiento de todo el sistema. Sin embargo, cuando se examinó el funcionamiento del suelo y el ciclado del agua, el impacto no resultó evidente (Figura 4.5).

Otro problema del índice, y de cualquier índice en general, es determinar qué magnitud de cambio en este implica un impacto biológico en el sistema, es decir, determinar su sensibilidad. En este sentido, las diferencias que se pudieron observar en el caso de estudio fueron pequeñas, pero significativas. Es importante tener en cuenta que

la evaluación es a largo plazo, por lo que cualquier cambio por más chico que sea está impactando el sistema por mucho tiempo. La escala temporal y espacial pueden ayudar a interpretar mejor la importancia biológica de los cambios en la multifuncionalidad. Asimismo, los objetivos de manejo que motivaron al uso del índice también pueden sentar las bases teóricas para la toma de decisiones en base a índices. Esta realidad es común a cualquier índice, ya que las decisiones, aún basadas en información, requieren del sesgo juicioso de los tomadores de decisiones.

En conclusión, este trabajo aporta una perspectiva valiosa para el desarrollo de nuevos índices de MF más aplicados y propone un índice funcional que es, como todos, perfectible. Entre sus cualidades destacables está la facilidad de cálculo, su versatilidad y su practicidad para responder a objetivos precisos. Por otra parte, sus debilidades radican en la imposibilidad de determinar su eficacia y eficiencia para estimar el valor real de la MF, y la necesidad de tener mucha información y experiencia en el área estudiada para poder elegir correctamente las funciones ecosistémicas a considerar.

CAPÍTULO 5 - Discusión General

5.1. Introducción

Esta Tesis representa un avance en el conocimiento de las comunidades microbianas de suelo y su funcionamiento en los pastizales de la Pampa Deprimida, y el cambio en las comunidades frente a los dos aspectos del manejo de pastizales con impacto global: el enriquecimiento con nutrientes y la introducción de ganado bovino. Las comunidades microbianas de pastizales ganaderos se habían descrito en otros estudios, pero no en los pastizales de la Pampa Deprimida, que tienen la particularidad de tener un régimen de inundación. Además, este estudio incluyó un novedoso experimento factorial con el agregado de nutrientes y exclusiones al pastoreo que permitió analizar los efectos de la producción ganadera en las comunidades del suelo ante escenarios de enriquecimiento de nutrientes como los esperados con el cambio global. Los procesos de suelo mediados por microorganismos y el análisis holístico del funcionamiento de pastizales ganaderos estaban comprendidos de manera incompleta, y los principales vacíos de conocimiento fueron abordados en esta Tesis.

En este capítulo, se enumeran los principales resultados obtenidos en este trabajo de Tesis y se analiza el significado y las implicancias de estos resultados en el marco del estado actual del conocimiento y de las problemáticas planteadas en el capítulo introductorio. Además, se analiza el ciclo completo del N en los pastizales estudiados, introduciendo los datos aportados por esta Tesis y presentados en los capítulos anteriores, lo que demuestra la relevancia aplicada de este estudio.

5.2. Principales resultados obtenidos en esta Tesis

Los pastizales de la Pampa Deprimida han sido estudiados en detalle y la relevancia del uso productivo fue descrita y analizada en trabajos anteriores (Chaneton et al. 1996, 2002, Campana et al. 2022). Sin embargo, hasta el presente no se había descrito la composición y función de las comunidades del suelo ni su sensibilidad ante cambios ambientales inducidos por el uso ganadero y los nutrientes. En cuanto a la comunidad de microorganismos del suelo, en los pastizales de la Pampa Deprimida, uno de los aportes novedosos de esta Tesis fue describir la diversidad específica mediante

métodos de secuenciación masiva de ADN de suelo tanto de hongos como de bacterias (Capítulo 2). Gracias a esta descripción, se pudo determinar que el agregado de nutrientes altera significativamente la composición de bacterias y hongos, mientras que el pastoreo sólo genera cambios marginales en la composición de hongos. Estos cambios en la composición microbiana estuvieron asociados a cambios sustanciales en la abundancia relativa de algunos taxones poco abundantes, por lo que no incidieron en la diversidad de las comunidades. Curiosamente, no se encontró relación entre los cambios en las comunidades microbianas de suelo descritas en esta Tesis con los efectos en las comunidades de plantas informados en otros trabajos. Esta diferencia en la respuesta de ambas comunidades posiblemente sea porque las comunidades de plantas se vieron alteradas en mayor medida frente a la fertilización y sobre todo al pastoreo que las de microorganismos del suelo. En síntesis, en este trabajo se encontró que cuatro años de fertilización y trece años de exclusión del pastoreo modificaron levemente las comunidades microbianas del suelo, en contraste con los cambios contundentes que provocaron estos manejos en las comunidades de plantas.

Por otra parte, en cuanto a los procesos de suelo mediados por los microorganismos, se vio que la adición de nutrientes aumentó temporalmente las emisiones de N_2O del pastizal, pero sorprendentemente, la exclusión del ganado no disminuyó las emisiones de N_2O ni la fijación biológica de N, después de 13 años de exclusión del pastoreo (Capítulo 3). De hecho, la fijación de N aumentó en un contexto enriquecido en nutrientes en la condición pastoreada del pastizal, contrariamente a lo esperado. Los efectos de estos manejos no se vieron reflejados en la mineralización neta de N ni lo capturado en la biomasa microbiana o el suelo. Sin embargo, la tasa de respiración de suelo, que cuando es medida en condiciones potenciales describe en rasgos muy generales la actividad microbiana, se vio incrementada por la fertilización tanto en la condición pastoreada como en la clausura. Esta visión parcial del ciclo del N en el pastizal que se desarrolló en el capítulo 3 va a ser complementada con una visión holística que se desarrolla en este capítulo de discusión general (ver más abajo la sección Relevancia Aplicada).

Escalando a una visión aún más abarcativa de todo el ecosistema, se evaluó la multifuncionalidad del pastizal con un nuevo índice propuesto en esta Tesis (Capítulo 4). La multifuncionalidad de los ecosistemas no es fácil de medir ya que varía ampliamente

entre sistemas y a lo largo del tiempo. Esta complejidad no puede ser reflejada por un set de variables prefijadas que pueda aplicarse a todos los ecosistemas terrestres. Por esta razón, el índice propuesto en este trabajo deriva de la elección de las mejores funciones para representar la multifuncionalidad y poder evaluar el impacto de disturbios según la escala temporal y espacial afectada. El nuevo índice apunta a mejorar la practicidad y la interpretación, ya que, al estar desglosado en 4 subíndices, permite visualizar fácilmente qué área está pesando dentro del índice general para que aumente o disminuya la multifuncionalidad del ecosistema, de tal forma que sea más fácil evaluar una medida de manejo del ecosistema. Con el nuevo índice, se pudo constatar que, en los pastizales estudiados, los lotes con ganado son los que tienen mayor multifuncionalidad. Esto significa que excluir las vacas de este pastizal reduce significativamente su multifuncionalidad, y al estudiar los subíndices se pueden entender las causas de esta reducción. En cuanto a los componentes de la multifuncionalidad que se ven afectados por los tratamientos, la fertilización aumentó la producción de biomasa de plantas, mientras que el pastoreo mejoró el ciclado del agua y aumentó la biodiversidad del sistema. El efecto positivo de la fertilización sobre la producción forrajera es de esperar cuando hay una limitación al crecimiento de las plantas por falta de nutrientes. Por otra parte, se observó que, en este pastizal, el pastoreo limita la dominancia de *Festuca alta*, una especie exótica invasora, por lo que el efecto positivo del pastoreo en la biodiversidad era esperable (Campana et al. 2022). Sin embargo, el efecto positivo del pastoreo sobre el ciclado del agua es novedoso. Esto puede deberse a la promoción del rebrote del pastizal en respuesta al pastoreo, y la disminución de la cantidad de biomasa muerta en pie, aprovechando el agua disponible. En conclusión, en cuanto al manejo del pastizal, el nuevo índice de multifuncionalidad propuesto arroja recomendaciones interesantes: no excluir al ganado, puesto que controla a la especie invasora que rápidamente se vuelve dominante, *Festuca alta*, y considerar cuidadosamente la posibilidad de fertilizar el pastizal bajo uso ganadero para conseguir mayor producción de forraje, ya que no disminuye la multifuncionalidad del sistema. Sin embargo, hay que destacar que esta práctica puede llevar a la dominancia del pastizal y la pérdida de diversidad vegetal (Campana y Yahdjian 2021).

5.3. Significado e implicancias de estos resultados

5.3.1. Relevancia aplicada

Presentación y resultados del nuevo presupuesto de nitrógeno

Hay muy pocos ejemplos de ciclos completos que describan la dinámica del nitrógeno en pastizales, por lo que se consideró relevante integrar los resultados de esta Tesis y completarlos con información bibliográfica del ciclo de N en los pastizales de la Pampa Deprimida. Chaneton y colaboradores (1996) estimaron la mayoría de los flujos y reservorios de N en los pastizales de la Pampa Deprimida evaluando los cambios con el pastoreo, por lo que se tomó dicho estudio como referencia. En esta sección, se presenta el ciclo del nitrógeno a escala del ecosistema y se analizan los procesos microbianos claves involucrados en las entradas y salidas de N en respuesta a la exclusión de herbívoros y la adición de nutrientes en los pastizales de la Pampa Deprimida Argentina. Para realizarlo, se evaluaron los principales reservorios y flujos de N y su respuesta a la exclusión del pastoreo y la fertilización mediante la compilación de datos originales y datos publicados, como se especifica en el Cuadro 5.1. La comparación entre las parcelas pastoreadas o clausuradas (sin fertilización) o entre las parcelas fertilizadas y no fertilizadas bajo pastoreo, se evaluó a través de ANOVA o Kruskal Wallis (no paramétrico) dependiendo de la normalidad de la variable.

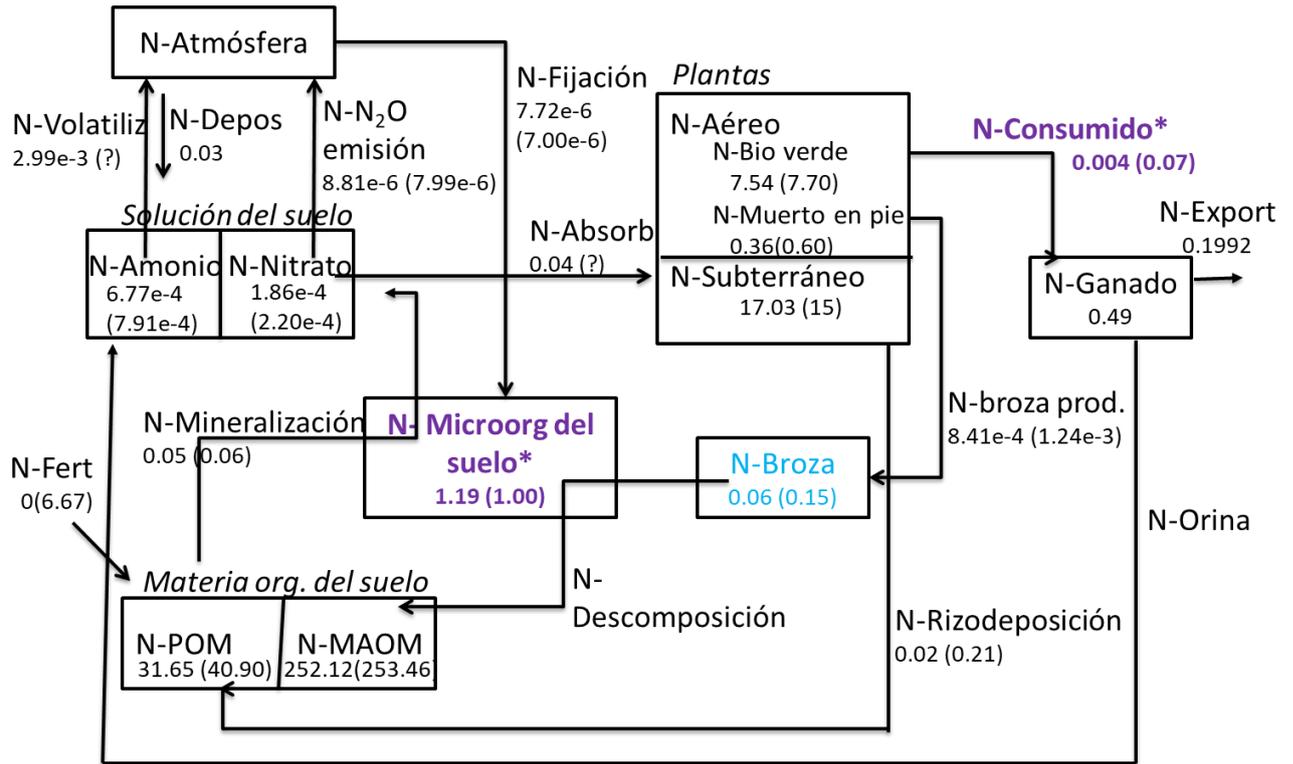


Figura 5.1. Ciclo del nitrógeno en un pastizal nativo pastoreado en la Pampa Deprimida sin fertilización (primer número) y en el escenario con fertilización (números entre paréntesis). Las reservas de nitrógeno están representadas por recuadros (gN m⁻²) y las flechas muestran los flujos de nitrógeno (gN m⁻² d⁻¹) en la época de máxima productividad de las plantas (diciembre-abril, 150 días). Los asteriscos indican flujos o reservorios que cambiaron significativamente con la fertilización ($p < 0.05$). Las estimaciones de Fijación de N provienen de la fijación de bacterias de vida libre. En el Cuadro 5.1 se detallan las fuentes de datos y los cálculos realizados.

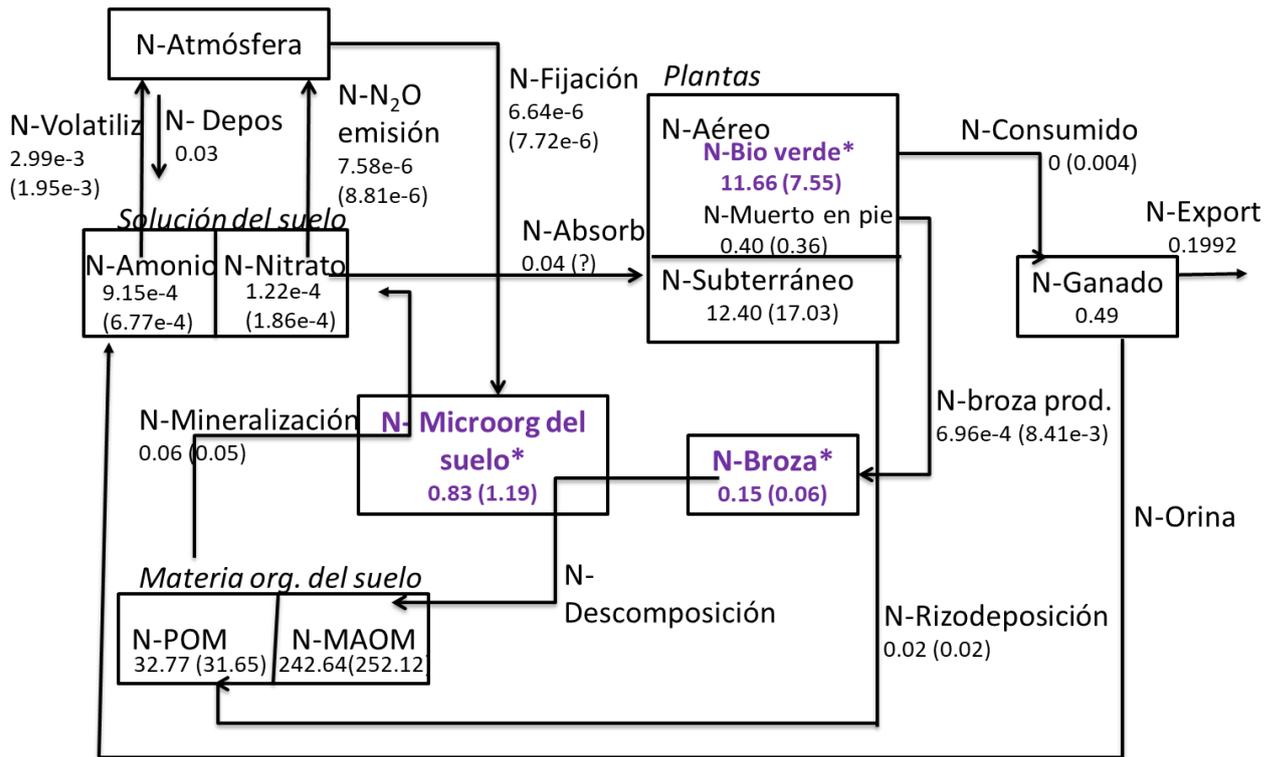


Figura 5.2. Ciclo del nitrógeno en un pastizal en la Pampa Deprimida excluyendo el ganado (primer número) y con ganado (números entre paréntesis), sin fertilización en ambos casos. Los reservorios de nitrógeno están representadas por recuadros (gN m⁻²) y las flechas muestran los flujos de nitrógeno (g N m⁻² d⁻¹) durante la época de máxima productividad de las plantas (diciembre-abril, 150 días), excepto la carga de ganado y la exportación que son anuales. Los asteriscos indican flujos o reservorios que cambiaron significativamente con la exclusión del ganado (p < 0.05). Las estimaciones de Fijación de N provienen de la fijación de bacterias de vida libre. En el Cuadro 5.1 se detallan las fuentes de datos y los cálculos realizados.

En las Figuras 5.1 y 5.2 se puede observar el ciclo completo de N de los pastizales pastoreados de la Pampa Deprimida en dos escenarios distintos: pastoreo con y sin fertilización (Figura 5.1) y con y sin exclusión al pastoreo (sin fertilización, Figura 5.2). A continuación, se describirá lo observado en la situación del pastizal en su estado natural, con pastoreo y sin fertilización. En cuanto a los reservorios de N, se observó que la mayor cantidad de N en el sistema se almacenó en el suelo como materia orgánica, mientras que el N en la solución del suelo fue 6 órdenes de magnitud menor (Fig. 5.1, y Cuadro 5.1). El N orgánico del suelo fue almacenado en las dos fracciones en cantidades muy distintas, 88% como N-MOAM y 12%, como N-MOP. El siguiente reservorio más grande de N se encontró en la biomasa vegetal, con un 46% más N debajo del suelo que sobre el suelo (Fig. 5.1 y Cuadro 5.1). Los microorganismos, el ganado y el suelo fueron reservorios

relativamente pequeños de N, a pesar de su importante papel en el ciclo de este elemento. En cuanto a los flujos de N, los aportes de N al sistema fueron bajos y se limitaron a dos procesos: la fijación biológica por microorganismos de vida libre en el suelo y la deposición atmosférica. La deposición atmosférica de N resultó ser 4 órdenes de magnitud menor que la fijación biológica de N (Fig. 5.1 y Cuadro 5.1). Las principales salidas de N en este sistema fueron la emisión de óxido nitroso (desnitrificación y nitrificación) y volatilización, y por exportación de ganado (se estimó una exportación de 83 kg carne por hectárea por año, (Recavarren et al. 2021)). Las pérdidas por volatilización fueron superiores a las pérdidas por emisión de óxido nitroso, pero comparables a la entrada de N por fijación biológica (Fig. 5.1).

La adición de nutrientes (fertilización con NPK) produjo algunos cambios en la dinámica del N en el pastizal. Como se observa en la Figura 5.1, hubo un aumento en el consumo de biomasa vegetal por el ganado y el contenido de N de las plantas debido a la fertilización, por lo que no hubo efecto en la cantidad neta de N en la biomasa de las plantas. La adición de nutrientes también indujo una ligera disminución de N en la biomasa microbiana, pero no produjo cambios en el N del suelo ni en la mineralización neta de N (Fig. 5.1). La rizodeposición aumentó debido a la mayor abundancia de leguminosas, pero estos datos se estimaron a partir de la bibliografía y no se pudieron probar estadísticamente.

Por su parte, la exclusión del ganado también produjo cambios en el ciclo de N (Figuras 5.2). En ausencia de pastoreo se incrementaron significativamente los reservorios de N en la biomasa y la broza de las plantas, pero el N orgánico e inorgánico del suelo no cambió. No se encontraron cambios en el nitrógeno subterráneo, el N de la rizodeposición o la mineralización neta de N, pero la exclusión del ganado disminuyó el N en la biomasa microbiana (Figura 5.2). La fijación de nitrógeno y la emisión de óxido nitroso no se vieron alteradas por la exclusión del ganado como se mostró en detalle en el capítulo 3.

Discusión y conclusiones del nuevo presupuesto de Nitrógeno

En cuanto a las expectativas antes de comenzar este estudio, la adición de nutrientes aumentó las emisiones de N₂O, ya que había más sustrato para la desnitrificación, que provoca emisión de óxido nitroso. Sin embargo, este aumento sólo duró unos días después

de la aplicación del fertilizante. Contrariamente a lo esperado, la fijación de N aumentó en lugar de disminuir en el contexto enriquecido en nutrientes, lo que sólo fue significativo en el pastizal pastoreado. Considerando todo el ciclo del N, el efecto de aumentar las entradas en el sistema fue muy bajo y se limitó a dos procesos: la fijación biológica por microorganismos de vida libre en el suelo y la deposición atmosférica. En cuanto a la fijación simbiótica de N, no se contó con estimaciones del proceso, pero se dedujo, a partir de la abundancia de leguminosas, que fue muy baja con la exclusión del ganado, y la abundancia aumentó con la presencia de pastoreo doméstico. Las principales salidas de N en el sistema estudiado fueron muy estables incluso cuando hubo fertilización. Se encontraron sólo ligeros cambios en la emisión de óxido nitroso y la volatilización de amonio (estimada a partir de bibliografía). La lixiviación de N se consideró nula debido al suelo arcilloso del sitio. Las pérdidas por volatilización fueron superiores a las pérdidas por emisión de óxido nitroso, pero comparables a las entradas de N por fijación biológica. En conclusión, la dinámica del N cambió de formas sutiles que sólo podían entenderse correctamente analizando todo el ciclo del N como se hizo en este trabajo.

La exclusión del ganado indujo cambios importantes en el N en la biomasa vegetal. El aumento de N en la biomasa verde y la broza fueron significativos y estuvieron mediados por el aumento de la biomasa vegetal (Figuras 5.2). El contenido de N en las hojas fue sólo ligeramente superior con exclusión del ganado, pasó de 1.42 a 1.52%. Se esperaba que la remoción de ganado tuviera un efecto positivo en el contenido de N de las plantas, debido a un aumento en la abundancia de leguminosas, pero este efecto no fue evidente debido al predominio de *Festuca* alta en las clausuras, donde domina la comunidad vegetal. Sin embargo, el N del suelo permaneció sin cambios (Figuras 5.2). En otros sitios de estudio de la red The Nutrient Network también se encontró que la exclusión de herbívoros no tuvo impacto en las reservas de N del suelo en pastizales no fertilizados (Sitters et al. 2020). Sin embargo, se encontró una disminución general del N cuando se excluyó el ganado en condiciones de fertilización probablemente por el mayor consumo (Campana and Yahdjian 2021). En el presente estudio, no se encontraron cambios en el N en la materia orgánica del suelo, pero el N en la biomasa microbiana aumentó levemente. Esta recuperación del N en la biomasa microbiana se ha encontrado también en pastizales restaurados que habían sido expuestos a sobrepastoreo en Mongolia

(Wu et al. 2014). El contenido de amonio aumentó con la exclusión del ganado, pero no la mineralización, lo que podría significar que este reservorio creció debido a la reducción de la producción (Figuras 5.2). De hecho, en las clausuras las pérdidas por emisión de óxido nitroso tendieron a reducirse en un 14% lo que podría estar relacionado con la ausencia de orina (Luo et al. 2008). La volatilización de amonio también tendió a reducirse en las clausuras (35%), mientras que los aportes de N por fijación de N tuvieron una tendencia a reducirse en un 14%. Como consecuencia, los cambios en las entradas y salidas del sistema se compensaron y, por lo tanto, el N en el ecosistema no cambió, se reubicó en la biomasa vegetal, el amonio en el suelo y la biomasa microbiana.

La adición de nutrientes en los pastizales de pastoreo de la Pampa Deprimida aumentó sólo temporalmente las salidas de N del sistema, por lo que incrementó el N en el sistema (tendencia). De hecho, las emisiones de óxido nitroso no cambiaron debido a la fertilización en las parcelas pastoreadas. Este resultado difiere al considerar las clausuras, probablemente debido a los efectos contrapuestos que se esperaba encontrar entre la exclusión del pastoreo y la fertilización. Por otro lado, la fijación biológica de N tampoco cambió. El N tendió a almacenarse en la biomasa vegetal aérea y en la broza, como se esperaba, porque las plantas en estos pastizales tienen limitaciones de N y P (Rodríguez et al. 2007; Semmartin et al. 2007). Sin embargo, no se encontró un aumento en el N en la materia orgánica del suelo, pero sí aumentó la tendencia a acumular el N en forma inorgánica en el suelo mientras que, sorprendentemente, el N en la biomasa microbiana disminuyó. Se esperaba que los microbios del suelo tuvieran limitaciones de nutrientes como las plantas, pero parece que la adición de N podría ser responsable de una disminución en la biomasa microbiana y un aumento en la respiración del suelo cuando los microbios tienen limitaciones de C (Treseder 2008). En síntesis, el ciclo del nitrógeno parece verse alterado por la adición de nutrientes en los pastizales bajo uso ganadero, pero su complejidad amortiguó los efectos, por lo que este enfoque holístico del sistema es la única forma de percibir los cambios.

En conclusión, en esta sección de la tesis se presentó un ciclo de N actualizado y completo para pastizales en la Región Pampeana Deprimida. En general, los flujos y reservorios de N están en el mismo rango que el estimado por Chaneton y colaboradores (1996). Sin embargo, en este trabajo se incluyeron más detalles del ciclo del N al agregar el fraccionamiento de la materia orgánica del suelo y la biomasa microbiana, entre otros.

La principal diferencia que se encontró respecto de los valores informados en el estudio anterior fue el aumento de la deposición atmosférica de N, probablemente debido a la contaminación atmosférica y al uso de fertilizantes en la zona. Además, en este trabajo se estimaron los cambios en el ciclo del N cuando se fertilizan los pastizales pastoreados, lo que no se había descripto antes.

Cuadro 5.1. Selección de datos y especificaciones de cálculos realizados para obtener el presupuesto del ciclo de nitrógeno completo en los pastizales de la Pampa Deprimida bajo uso pastoreo y clausuras en escenarios de aumento de nutrientes, presentado en las figuras 5.1 y 5.2 respectivamente. En negrita se muestran los procesos o atributos que se modificaron significativamente ($P < 0,05$) con la exclusión del pastoreo o la fertilización. NA: no aplicable.

Variable	Fechas de medición	Tipo de estimación	de	Valor de p del efecto de exclusión de pastoreo (sin fertilizar)	Valor p del efecto de la adición de nutrientes (con pastoreo)
Emisión de N- N ₂ O	11/2016, 12/2016, 02/2017 y 03/2017	Medición de campo	de	0.36	0.56
N-FBN	11/2016, 12/2016, 02/2017, 03/2017 y 04/2017	Medición de campo	de	0.54	0.59
N-NO ₃ del suelo	11/2016, 12/2016, 02/2017, 03/2017 y 04/2017	Medición de campo (0-10 cm de profundidad en el suelo)	de	0.11	0.68
N-NH ₄ del suelo	11/2016, 12/2016, 02/2017, 03/2017 y 04/2017	Medición de campo (0-10 cm de profundidad en el suelo)	de	0.50	0.76
N- MOP	2016	Medición de campo (0-10 cm de profundidad)	de	0.78	0.12
N- MOAM	2016	Medición de campo (0-10 cm de profundidad)	de	0.50	0,92
N-BM	2016 y 2017	Medición de campo (0-10 cm de profundidad en el suelo)	de	0.002	0.003

N-Mineralización	20/3 - 1/5/2015	Medición de campo	0.42	0.16
N-Biomasa radical	12/03/2016	Estimado utilizando datos de campo. Se asumió contenido de 1.1% N (Pinto en prensa).	0.31	0.52
N-Biomasa verde	Marzo 2017 y 2016	Estimado utilizando datos de campo. A partir de la biomasa verde medida se estimó el contenido de nitrógeno de la misma (Campana and Yahdjian 2021).	0.03	0.93
N-Biomasa muerta en pie	Marzo 2017 y 2016	Estimado utilizando datos de campo. Se asumió 0.83% N en hojas senescentes (Oyarzabal et al., 2008).	0.70	0.40
N-Broza	Marzo 2017 y 2016	Estimado utilizando datos de campo. Se asumió 0.83% N en hojas senescentes (Oyarzabal et al. 2008).	0.002	0.02
N-Consumido	2017	Estimado utilizando datos de campo con jaulas. También se midió el %N en la biomasa aérea (Campana and Yahdjian 2021) .	NA	0.003
N-ganado	2017	Estimado de bibliografía. Se consideró la carga animal (0,52 EV/ha) y 2,4% contenido de N (Animal Research Council).	NA	NA
N-Deposición	2007-2012	Estimado de bibliografía (Carnelos 2019).	NA	NA

N-Absorción de plantas	1600-1970	Estimado de bibliografía (Piñeiro 2006).	valor estimativo	valor estimativo
N-Rizodeposición	2016	Estimado utilizando datos de campo. Se consideró rizodeposición de raigrás (Høgh-Jensen and Schjoerring 2001) y abundancia de leguminosas medida.	valor estimativo	valor estimativo
N-Broza producida	2017	Estimado con datos de campo como la diferencia entre muerto en pie y broza.	0.01	0.09
N-volatilización	2003	Estimado de bibliografía (Piñeiro 2006). No se pudo estimar el efecto de la fertilización.	valor estimativo	valor estimativo
N-Exportación de carne	2009-2019	Estimado de bibliografía (Recavarren et al. 2021) . 2,4% contenido de N (Animal Research Council).	NA	NA

5.4. Perspectivas futuras

Este trabajo de tesis profundizó en el estudio de los microorganismos del suelo y las funciones asociadas, y sus cambios ante dos factores de cambio global, la intensidad de uso productivo y el enriquecimiento de nutrientes. De estas comunidades y sus factores de control había escasa información en los pastizales de la región de la Pampa Deprimida y este trabajo viene a llenar en parte ese vacío. Sin embargo, hay áreas del conocimiento que no se han podido abarcar en esta Tesis por cuestiones de tiempo, pero que sería muy interesante encarar en futuros trabajos. En ese sentido, se considerará en los párrafos siguientes tres áreas que se identifican como prioritarias para la profundización de este estudio.

5.4.1. Profundizar el conocimiento de las comunidades microbianas del suelo que permita vincular la identidad de los microorganismos con su función

Actualmente, estudiar la composición de las comunidades microbianas no permite saber sobre su rol en el ecosistema, porque todavía no hay una articulación entre la composición de microorganismos del suelo y su función. Las bases de datos sobre genes microbianos tienen poca información sobre microorganismos del suelo, la información genómica que existe sobre ellos es muy escasa, y la mayoría no ha sido cultivado *in vitro*. Por estas razones, todavía se desconocen los atributos ecológicos de la mayoría de los microorganismos del suelo, tales como sus preferencias ambientales y sus capacidades metabólicas. Sin embargo, la correlación encontrada entre la composición microbiana, factores ambientales y procesos ecosistémicos ofrece algunas pistas sobre esos atributos ecológicos que valdría la pena profundizar. Sobre todo, para los grupos identificados que responden a la fertilización y al pastoreo. Además, el estudio de las comunidades por secuenciación del ADN se complementaría muy bien con la secuenciación de ARN, que indica la expresión de los genes que están activos en el suelo. Los estudios recientes de secuenciación de ADN y ARN total del suelo de forma simultánea son prometedores para poder aproximarse al interrogante de la conexión entre identidad y función de los microorganismos del suelo (Carvalhais et al. 2012, Overy et al. 2021). Un estudio de ARN (metatranscriptómica) para determinar genes funcionales en los suelos de los pastizales pampeanos aportaría mucha información para comprender los procesos que los microorganismos median en estos suelos.

Otro aspecto interesante sería poder cuantificar el aporte de los microorganismos fijadores de N fotosintéticos, mayoritariamente las cianobacterias, contra las heterótrofas. Para ello, sería factible utilizar el método del acetileno sobre muestras de suelo incubadas y con y sin luz, y obtener la cantidad fijada por las bacterias fotosintéticas por diferencia.

5.4.2. Completar el presupuesto del C con énfasis en la emisión de metano

En los pastizales pastoreados siempre hay otra preocupación relacionada con los gases de efecto invernadero que incluye fuertemente al metano. Este gas puede ser emitido en el suelo por microorganismos metanogénicos anaerobios que habitan la parte subsuperficial del suelo, pero parte de ese metano es reabsorbido por microorganismos

metanotróficos aerobios de las capas más superficiales del suelo. En consecuencia, el flujo de carbono de metano puede ser positivo o negativo, dependiendo del balance entre emisión y absorción. Ya ha sido estudiada la emisión producida por campos agrícolas y por el rumen del ganado vacuno, pero no se ha constatado si los suelos pastoreados reciben algún tipo de carga bacteriana de metanogénicos del bosteo de los animales o si el pisoteo de los animales promueve la emisión de metano por generar más sitios anaerobios. En general, la aplicación de fertilizante nitrogenado y a base de sulfatos desfavorecen a los organismos metanogénicos al haber otros aceptores de electrones distintos al CO₂, reduciendo la emisión de metano (Le Mer and Roger 2001). Sin embargo, no se tiene información de cómo es la emisión de metano en pastizales pastoreados que se fertilizan. El estudio del metano en los pastizales estudiados en esta Tesis y con el diseño experimental utilizado, podría ayudar a dilucidar mejor cómo funciona el ciclado de C en estos suelos y evaluar herramientas y manejos para reducir las emisiones de metano.

5.4.3. Desarrollar el aspecto social del índice de multifuncionalidad para su adopción como herramienta de manejo de ecosistemas

Los índices de multifuncionalidad como los desarrollados en el capítulo 4 de esta Tesis no son adoptados actualmente como herramientas de manejo, sino que permanecen en el ámbito académico, a pesar de su potencial aplicación. Algunas razones por las que estos índices no se implementan son que 1) no están directamente relacionados a los servicios que son objetivo del manejo; 2) no son fáciles de interpretar; 3) no son fáciles de medir; 4) no está estandarizado el método de cálculo; y 5) el desarrollo de los índices, divulgado en publicaciones científicas, no es accesible para los tomadores de decisiones. Los puntos 1, 2, 3 y 4 han sido desarrollados ampliamente en el capítulo 4 de esta Tesis, proponiendo algunas soluciones. Pero persiste el problema de la accesibilidad al índice cuando la información sólo se transmite mediante publicaciones científicas. Este hecho implica que la información sólo se divulga ente una comunidad científica de un tema determinado y aunque llegue a los tomadores de decisiones, está en un formato y lenguaje poco amigable que hace que la adopción sea dificultosa. Lo ideal sería desarrollar y

adaptar junto con los tomadores de decisiones el índice que cumpla con sus necesidades y expectativas.

Un índice de multifuncionalidad que pueda ser utilizado como herramienta de manejo debería tener las siguientes características:

- Ser útil (¿qué información necesita el tomador de decisiones?)
- Práctico (fácil de medir y calcular, pocas variables y precisas)
- Fácil de interpretar (lenguaje adecuado)
- Ser de fácil acceso.

Un próximo paso para que el índice propuesto por esta Tesis tenga un alcance social sería co-desarrollar con tomadores de decisiones sobre el uso de la tierra, como pueden ser distintos productores, ingenieros agrónomos, o asociaciones de los mismos, una aplicación para celular que les permita calcular el índice y, a su vez, obtener información útil para el manejo de los agroecosistemas. Esta aplicación tendría la gran ventaja de poder ser usada a campo, donde se presentan los problemas, estar ampliamente difundida y ser muy amigable para permitir la adopción por parte de personas con distinto grado de formación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, K., Y. Sun, M. Zarebanadkouki, T. Gaiser, S. Seidel, and J. Pausch. 2022. Long-term continuous farmyard manure application increases soil carbon when combined with mineral fertilizers due to lower priming effects. *Geoderma* 428:116216.
- Allison, S. D., and J. B. H. H. Martiny. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11512–11519.
- Baldi, G. G., and J. M. J. M. Paruelo. 2008. Land-Use and Land Cover Dynamics in South American Temperate Grasslands. *Ecology and Society* 13:6.
- Bardgett, R. D., D. K. Leemans, R. Cook, and P. J. Hobbs. 1997. Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1285–1294.
- Bardgett, R. D., J. L. Mawdsley, S. Edwards, P. J. Hobbs, J. S. Rodwell, and W. J. Davies. 1999. Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Functional Ecology* 13:650–660.
- Bastida, F., D. J. Eldridge, C. García, G. Kenny Png, R. D. Bardgett, and M. Delgado-Baquerizo. 2021. Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *The ISME Journal* 15:2081–2091.
- Beijerinck. 1913. *De infusies en de ontdekking der bacteriën*. Jaarboek van de Koninklijke Akademie v.
- Bennett, E., and J. Elser. 2011. A broken biogeochemical cycle. *Nature* 478:29–31.
- Birkhofer, K., G. K. S. Andersson, J. Bengtsson, R. Bommarco, J. Dänhardt, B. Ekbom, J. Ekroos, T. Hahn, K. Hedlund, and A. M. Jönsson. 2018. Relationships between multiple biodiversity components and ecosystem services along a landscape

complexity gradient. *Biological Conservation* 218:247–253.

Bissett, A., A. E. Richardson, G. Baker, and P. H. Thrall. 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology* 51:66–78.

Blesh, J. 2018. Functional traits in cover crop mixtures: Biological nitrogen fixation and multifunctionality. *Journal of Applied Ecology* 55:38–48.

Bobbink, R., K. Hicks, J. Galloway, T. Spranger, R. Alkemade, M. Ashmore, M. Bustamante, S. Cinderby, E. Davidson, F. Dentener, B. Emmett, J.-W. W. Erisman, M. Fenn, F. Gilliam, a. Nordin, L. Pardo, W. De Vries, R. B. Obbink, K. H. Icks, J. G. Alloway, T. S. Pranger, R. A. Lkemade, M. A. Shmore, M. B. Ustamante, R. Bobbink, K. Hicks, J. Galloway, T. Spranger, R. Alkemade, M. Ashmore, M. Bustamante, S. Cinderby, E. Davidson, F. Dentener, B. Emmett, J.-W. W. Erisman, M. Fenn, F. Gilliam, a. Nordin, L. Pardo, W. De Vries, R. B. Obbink, K. H. Icks, J. G. Alloway, T. S. Pranger, R. A. Lkemade, M. A. Shmore, M. B. Ustamante, R. Bobbink, K. Hicks, J. Galloway, T. Spranger, R. Alkemade, M. Ashmore, S. Cinderby, E. Davidson, F. Dentener, B. Emmett, J.-W. W. Erisman, M. Fenn, a. Nordin, L. Pardo, W. De Vries, K. Hicks, J. Galloway, R. Bobbink, E. Davidson, F. Dentener, S. Cinderby, T. Spranger, M. Bustamante, S. Cinderby, E. Davidson, F. Dentener, B. Emmett, J.-W. W. Erisman, M. Fenn, F. Gilliam, a. Nordin, L. Pardo, and W. De Vries. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: A synthesis. *Ecological Applications* 20:30–59.

Bodelier, P. L. E. 2011. Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 2:1–8.

Bolyen, E., J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K.

Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E. K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J. M. Gauglitz, S. M. Gibbons, D. L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G. A. Huttley, S. Janssen, A. K. Jarmusch, L. Jiang, B. D. Kaehler, K. Bin Kang, C. R. Keefe, P. Keim, S. T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J. Kreps, M. G. I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B. D. Martin, D. McDonald, L. J. McIver, A. V Melnik, J. L. Metcalf, S. C. Morgan, J. T. Morton, A. T. Naimey, J. A. Navas-Molina, L. F. Nothias, S. B. Orchanian, T. Pearson, S. L. Peoples, D. Petras, M. L. Preuss, E. Pruesse, L. B. Rasmussen, A. Rivers, M. S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S. J. Song, J. R. Spear, A. D. Swafford, L. R. Thompson, P. J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P. J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J. J. J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K. C. Weber, C. H. D. Williamson, A. D. Willis, Z. Z. Xu, J. R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, and J. G. Caporaso. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37:852–857.

Bongaarts, J. 2019. IPBES, 2019. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. *Population and Development Review* 45:680–681.

Borer, E. T., J. B. Grace, W. S. Harpole, A. S. MacDougall, and E. W. Seabloom. 2017. A decade of insights into grassland ecosystem responses to global environmental change. *Nature Ecology and Evolution* 1:1–7.

- Borer, E. T., E. W. Seabloom, D. S. Gruner, W. S. Harpole, H. Hillebrand, E. M. Lind, P. B. Adler, J. Alberti, T. M. Anderson, J. D. Bakker, L. Biederman, D. Blumenthal, C. S. Brown, L. A. Brudvig, Y. M. Buckley, M. Cadotte, C. Chu, E. E. Cleland, M. J. Crawley, P. Daleo, E. I. Damschen, K. F. Davies, N. M. DeCrappeo, G. Du, J. Firn, Y. Hautier, R. W. Heckman, A. Hector, J. HilleRisLambers, O. Iribarne, J. A. Klein, J. M. H. Knops, K. J. La Pierre, A. D. B. Leakey, W. Li, A. S. MacDougall, R. L. McCulley, B. A. Melbourne, C. E. Mitchell, J. L. Moore, B. Mortensen, L. R. O'Halloran, J. L. Orrock, J. Pascual, S. M. Prober, D. A. Pyke, A. C. Risch, M. Schuetz, M. D. Smith, C. J. Stevens, L. L. Sullivan, R. J. Williams, P. D. Wragg, J. P. Wright, and L. H. Yang. 2014. Herbivores and nutrients control grassland plant diversity via light limitation. *Nature* 508:517–520.
- Brussaard, L., P. C. de Ruiter, and G. G. Brown. 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121:233–244.
- Buchkowski, R. W., M. A. Bradford, A. S. Grandy, O. J. Schmitz, and W. R. Wieder. 2017. Applying population and community ecology theory to advance understanding of belowground biogeochemistry. *Ecology Letters* 20:231–245.
- Byrnes, J. E. K., L. Gamfeldt, F. Isbell, J. S. Lefcheck, J. N. Griffin, A. Hector, B. J. Cardinale, D. U. Hooper, L. E. Dee, J. Emmett Duffy, and J. E. Duffy. 2014. Investigating the relationship between biodiversity and ecosystem multifunctionality: Challenges and solutions. *Methods in Ecology and Evolution* 5:111–124.
- Cai, Z., G. Xing, X. Yan, H. Xu, H. Tsuruta, K. Yagi, and K. Minami. 1997. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant and Soil* 196:7–14.
- Cambardella, C. A., and E. T. Elliott. 1992. Particulate Soil Organic-Matter Changes

- across a Grassland Cultivation Sequence. *Soil Sci Soc Am J* 56:777–783.
- Campana, S., P. M. Tognetti, and L. Yahdjian. 2022. Livestock exclusion reduces the temporal stability of grassland productivity regardless of eutrophication. *Science of The Total Environment*:152707.
- Campana, S., and L. Yahdjian. 2021. Plant quality and primary productivity modulate plant biomass responses to the joint effects of grazing and fertilization in a mesic grassland. *Applied Vegetation Science* 24:e12588.
- Caride, C., G. Piñeiro, and J. M. Paruelo. 2012. How does agricultural management modify ecosystem services in the Argentine Pampas? The effects on soil C dynamics. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 154:23–33.
- Carnelos, D. A., S. I. Portela, E. G. Jobbágy, R. B. Jackson, C. M. Di Bella, D. Panario, C. Fagúndez, J. M. Piñeiro-Guerra, L. Grion, and G. Piñeiro. 2019. A first record of bulk atmospheric deposition patterns of major ions in southern South America. *Biogeochemistry* 144:261–271.
- Castellano, M. J., K. E. Mueller, D. C. Olk, J. E. Sawyer, and J. Six. 2015. Integrating plant litter quality, soil organic matter stabilization, and the carbon saturation concept. *Global Change Biology* 21:3200–3209.
- Carvalhais, L. C., P. G. Dennis, G. W. Tyson, and P. M. Schenk. 2012. Application of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiological Methods* 91:246–251.
- Chapin, F., P. A. Matson, and P. M. Vitousek. 2012. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Page Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer New York.
- Chaneton, E. J., J. H. Lemcoff, and R. S. Lavado. 1996. Nitrogen and phosphorus cycling in grazed and ungrazed plots in a temperate subhumid grassland in Argentina. *Journal of Applied Ecology* 33:291–302.

- Chaneton, E. J., S. B. Perelman, M. Omacini, and R. J. C. León. 2002. Grazing, environmental heterogeneity, and alien plant invasions in temperate Pampa grasslands. *Biological Invasions* 4:7–24.
- Chapin F. Stuart, I. I. I., P. A. (Pamela A. . Matson, P. M. Vitousek, C. Chapin, F. S. Chapin, P. A. (Pamela A. . Matson, P. M. Vitousek, and M. C. Chapin. 2011. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. Springer.
- Chu, H., X. Lin, T. Fujii, S. Morimoto, K. Yagi, J. Hu, and J. Zhang. 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Page Soil Biology and Biochemistry*.
- Ciavattini, M. B. 2017. *Controles y dinámica de la abundancia de leguminosas en pastizales de la Pampa Deprimida*. Tesis de grado de la Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía.
- Cotrufo, M. F., M. D. Wallenstein, C. M. Boot, K. Deneff, and E. Paul. 2013. The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19:988–995.
- Cruzate GA y Casas R. 2012. Extracción y balance de nutrientes en los suelos agrícolas de la Argentina. *Informaciones Egronómicas de Hispanoamérica* 6:7–14.
- Dai, Z., W. Su, H. Chen, A. Barberán, H. Zhao, M. Yu, L. Yu, P. C. Brookes, C. W. Schadt, S. X. Chang, and J. Xu. 2018. Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Global Change Biology* 24:3452–3461.
- Daily, G. C., S. Alexander, P. R. Ehrlich, L. Goulder, J. Lubchenco, P. A. Matson, H. A. Mooney, S. Postel, S. H. Schneider, and D. Tilman. 1997. Ecosystem services: benefits supplied to human societies by natural ecosystems. *Page Issues in Ecology*.

Ecological Society of America, Washington (DC).

- Daubenmire, R. 1959. A canopy-coverage method of vegetational analysis. *Northwest Science*. 33:43–63.
- Della Chiesa, T., G. Piñeiro, and L. Yahdjian. 2019. Gross, Background, and Net Anthropogenic Soil Nitrous Oxide Emissions from Soybean, Corn, and Wheat Croplands. *Journal of Environmental Quality* 48:16–23.
- Delgado-Baquerizo, M., F. T. Maestre, P. B. Reich, T. C. Jeffries, J. J. Gaitan, D. Encinar, M. Berdugo, C. D. Campbell, and B. K. Singh. 2016. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications* 7:1–8.
- Delgado-baquerizo, M., A. M. Oliverio, T. E. Brewer, A. Benavent-gonzález, D. J. Eldridge, R. D. Bardgett, F. T. Maestre, B. K. Singh, and N. Fierer. 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 325:320–325.
- Deregibus, V. A., E. Jacobo, and A. Rodriguez. 1995. Improvement in rangeland condition of the flooding pampa of Argentina through controlled grazing. *African Journal of Range and Forage Science* 12:92–96.
- Díaz, S., S. Demissew, J. Carabias, C. Joly, M. Lonsdale, N. Ash, A. Larigauderie, J. R. Adhikari, S. Arico, A. Báldi, A. Bartuska, I. A. Baste, A. Bilgin, E. Brondizio, K. M. Chan, V. E. Figueroa, A. Duraiappah, M. Fischer, R. Hill, T. Koetz, P. Leadley, P. Lyver, G. M. Mace, B. Martin-Lopez, M. Okumura, D. Pacheco, U. Pascual, E. S. Pérez, B. Reyers, E. Roth, O. Saito, R. J. Scholes, N. Sharma, H. Tallis, R. Thaman, R. Watson, T. Yahara, Z. A. Hamid, C. Akosim, Y. Al-Hafedh, R. Allahverdiyev, E. Amankwah, S. T. Asah, Z. Asfaw, G. Bartus, L. A. Brooks, J. Caillaux, G. Dalle, D. Darnaedi, A. Driver, G. Erpul, P. Escobar-Eyzaguirre, P. Failler, A. M. M. Fouda, B. Fu, H. Gundimeda, S. Hashimoto, F. Homer, S. Lavorel, G. Lichtenstein, W. A. Mala, W. Mandivenyi, P. Matczak, C. Mbizvo, M. Mehrdadi,

- J. P. Metzger, J. B. Mikissa, H. Moller, H. a Mooney, P. Mumby, H. Nagendra, C. Nesshover, A. A. Oteng-Yeboah, G. Pataki, M. Roué, J. Rubis, M. Schultz, P. Smith, R. Sumaila, K. Takeuchi, S. Thomas, M. Verma, Y. Yeo-Chang, and D. Zlatanova. 2015. The IPBES Conceptual Framework — connecting nature and people. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 14:1–16.
- Díaz, S. M., J. Settele, E. Brondízio, H. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K. Brauman, and S. Butchart. 2019. The global assessment report on biodiversity and ecosystem services: Summary for policy makers.
- Douglas, A. E. 2010. The Significance of Symbiosis. *The Symbiotic Habit*.
- Dyer, M. I., J. K. Detling, D. C. Coleman, and D. W. Hilbert. 1982. The role of herbivores in grasslands. Pages 255–295 *in* J. R. Estes, R. J. Tylr, and J. N. Brunken, editors. *Grasses and Grasslands: Systematics and Ecology*. University Oklahoma Press., Oklahoma.
- Egidi, E., M. Delgado-Baquerizo, J. M. Plett, J. Wang, D. J. Eldridge, R. D. Bardgett, F. T. Maestre, and B. K. Singh. 2019. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications* 10:2369.
- Eldridge, D. J., S. K. Travers, J. Val, J.-T. Wang, H. Liu, B. K. Singh, and M. Delgado-Baquerizo. 2020. Grazing Regulates the Spatial Heterogeneity of Soil Microbial Communities Within Ecological Networks. *Ecosystems* 23:932–942.
- Erisman, J. W., J. N. Galloway, S. Seitzinger, A. Bleeker, N. B. Dise, A. M. R. Petrescu, A. M. Leach, W. De Vries, J. W. Erisman, and W. de Vries. 2013. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368:20130116.
- Fay, P. a., S. M. Prober, W. S. Harpole, J. M. H. Knops, J. D. Bakker, E. T. Borer, E. M. Lind, A. S. MacDougall, E. W. Seabloom, P. D. Wragg, P. B. Adler, D. M.

- Blumenthal, Y. M. Buckley, C. Chu, E. E. Cleland, S. L. Collins, K. F. Davies, G. Du, X. Feng, J. Firn, D. S. Gruner, N. Hagenah, Y. Hautier, R. W. Heckman, V. L. Jin, K. P. Kirkman, J. Klein, L. M. Ladwig, Q. Li, R. L. McCulley, B. a. Melbourne, C. E. Mitchell, J. L. Moore, J. W. Morgan, A. C. Risch, M. Schütz, C. J. Stevens, D. a. Wedin, and L. H. Yang. 2015. Grassland productivity limited by multiple nutrients. *Nature Plants* 1:15080.
- Feng, J., and B. Zhu. 2021. Global patterns and associated drivers of priming effect in response to nutrient addition. *Soil Biology and Biochemistry* 153:108118.
- Fierer, N., M. a. Bradford, and R. B. Jackson. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354–1364.
- Fierer, N., and R. B. Jackson. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103:626–631.
- Fierer, N., J. Ladau, J. C. Clemente, J. W. Leff, S. M. Owens, K. S. Pollard, R. Knight, J. a Gilbert, and R. L. McCulley. 2013. Reconstructing the Microbial Diversity and Function of Pre-Agricultural Tallgrass Prairie Soils in the United States. *Science* 342:621–624.
- Fierer, N., C. L. Lauber, K. S. Ramirez, J. Zaneveld, M. A. Bradford, and R. Knight. 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal* 6:1007–1017.
- Fierer, N., and J. T. Lennon. 2011. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany* 98:439–448.
- Flombaum, P., L. Yahdjian, and O. E. Sala. 2017. Global-change drivers of ecosystem functioning modulated by natural variability and saturating responses. *Global Change Biology* 23:503–511.
- Foley, J. A., R. DeFries, G. P. Asner, C. Barford, G. Bonan, S. R. Carpenter, F. S. Chapin,

- M. T. Coe, G. C. Daily, H. K. Gibbs, J. H. Helkowski, T. Holloway, E. A. Howard, C. J. Kucharik, C. Monfreda, J. A. Patz, I. C. Prentice, N. Ramankutty, and P. K. Snyder. 2005. Global Consequences of Land Use. *Science* 309:570–574.
- Fowler, N. L. 1988. What is a safe site?: Neighbor, litter, germination date, and patch effects. *Ecology*. 69:947–961.
- Frank, D. A., P. M. Groffman, R. D. Evans, and B. F. Tracy. 2000. Ungulate stimulation of nitrogen cycling and retention in Yellowstone Park grasslands. *Oecologia* 123:116–121.
- Frankow-Lindberg, B. E., and A. S. Dahlin. 2013. N₂fixation, N transfer, and yield in grassland communities including a deep-rooted legume or non-legume species. *Plant and Soil* 370:567–581.
- Galloway, J. N., F. J. Dentener, D. G. Capone, E. W. Boyer, R. W. Howarth, S. P. Seitzinger, G. P. Asner, C. C. Cleveland, P. A. Green, E. A. Holland, D. M. Karl, A. F. Michaels, J. H. Porter, A. R. Townsend, and C. J. Vörösmarty. 2004. Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70:153–226.
- Galloway, J. N., A. R. Townsend, J. W. Erisman, M. Bekunda, Z. Cai, J. R. Freney, L. a Martinelli, S. P. Seitzinger, and M. A. Sutton. 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science* 320:889–892.
- Garland, G., S. Banerjee, A. Edlinger, E. Miranda Oliveira, C. Herzog, R. Wittwer, L. Philippot, F. T. Maestre, and M. G. A. van Der Heijden. 2021. A closer look at the functions behind ecosystem multifunctionality: A review. *Journal of Ecology* 109:600–613.
- Groffman, P. M., R. Brumme, K. Butterbach-Bahl, K. E. Dobbie, A. R. Mosier, D. Ojima, H. Papen, W. J. Parton, K. A. Smith, and C. Wagner-Riddle. 2000. Evaluating annual nitrous oxide fluxes at the ecosystem scale. Page GLOBAL

BIOGEOCHEMICAL CYCLES.

- Groffman, P. M., K. Butterbach-Bahl, J. L. Morse, E. K. Stander, and C. Tague. 2009. Challenges to incorporating spatially and temporally explicit phenomena (hotspots and hot moments) in denitrification models. *Biogeochemistry* 93:49–77.
- Del Grosso, S. J., W. J. Parton, A. R. Mosier, M. K. Walsh, D. S. Ojima, and P. E. Thornton. 2006. DAYCENT National-Scale Simulations of Nitrous Oxide Emissions from Cropped Soils in the United States. *Journal of Environmental Quality* 35:1451–1460.
- Hardy, R. W. F. W. F., R. C. C. Burns, and R. D. D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5:47–81.
- Hautier, Y., F. Isbell, E. T. Borer, E. W. Seabloom, W. S. Harpole, E. M. Lind, A. S. MacDougall, C. J. Stevens, P. B. Adler, J. Alberti, J. D. Bakker, L. A. Brudvig, Y. M. Buckley, M. Cadotte, M. C. Caldeira, E. J. Chaneton, C. Chu, P. Daleo, C. R. Dickman, J. M. Dwyer, A. Eskelinen, P. A. Fay, J. Firn, N. Hagenah, H. Hillebrand, O. Iribarne, K. P. Kirkman, J. M. H. Knops, K. J. La Pierre, R. L. McCulley, J. W. Morgan, M. Pärtel, J. Pascual, J. N. Price, S. M. Prober, A. C. Risch, M. Sankaran, M. Schuetz, R. J. Standish, R. Virtanen, G. M. Wardle, L. Yahdjian, and A. Hector. 2018. Local loss and spatial homogenization of plant diversity reduce ecosystem multifunctionality. *Nature Ecology and Evolution* 2:50–56.
- Hoekstra, J. M., T. M. Boucher, T. H. Ricketts, and C. Roberts. 2005. Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters* 8:23–29.
- Høgh-Jensen, H., and J. K. Schjoerring. 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry* 33:439–448.

- Houlton, B. Z., Y.-P. Wang, P. M. Vitousek, and C. B. Field. 2008. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454:327–330.
- Isobe, K., S. D. Allison, B. Khalili, A. C. Martiny, and J. B. H. Martiny. 2019. Phylogenetic conservation of bacterial responses to soil nitrogen addition across continents. *Nature Communications* 10:2499.
- Jobbágy, E. G., S. Aguiar, G. Piñeiro, and L. A. Garibaldi. 2021. Impronta ambiental de la agricultura de granos en Argentina: revisando desafíos propios y ajenos. *Revista Ciencia Hoy* 29.
- Joergensen, R. G., and C. Emmerling. 2006. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169:295–309.
- Johnson, N. C., D. L. Rowland, L. Corkidi, L. M. Egerton-Warburton, and E. B. Allen. 2003. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology* 84:1895–1908.
- Jones, L., A. Provins, M. Holland, G. Mills, F. Hayes, B. Emmett, J. Hall, L. Sheppard, R. Smith, M. Sutton, K. Hicks, M. Ashmore, R. Haines-young, and L. Harpersimmonds. 2014. A review and application of the evidence for nitrogen impacts on ecosystem services. *Ecosystem Services* 7:76–88.
- Jones, S. E., and J. T. Lennon. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:5881–5886.
- Jousset, A., C. Bienhold, A. Chatzinotas, L. Gallien, A. Gobet, V. Kurm, K. Küsel, M. C. Rillig, D. W. Rivett, J. F. Salles, M. G. A. van der Heijden, N. H. Youssef, X. Zhang, Z. Wei, and W. H. G. Hol. 2017. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *The ISME Journal* 11:853–862.

- Keeney, D. R., and D. W. Nelson. 1983. Nitrogen—inorganic forms. *Methods of soil analysis: Part 2 chemical and microbiological properties* 9:643–698.
- Koerner, S. E., M. D. Smith, D. E. Burkepile, N. P. Hanan, M. L. Avolio, S. L. Collins, A. K. Knapp, N. P. Lemoine, E. J. Forrestel, S. Eby, D. I. Thompson, G. A. Aguado-Santacruz, J. P. Anderson, T. M. Anderson, A. Angassa, S. Bagchi, E. S. Bakker, G. Bastin, L. E. Baur, K. H. Beard, E. A. Beever, P. J. Bohlen, E. H. Boughton, D. Canestro, A. Cesa, E. Chaneton, J. Cheng, C. M. D'Antonio, C. Deleglise, F. Dembélé, J. Dorrough, D. J. Eldridge, B. Fernandez-Going, S. Fernández-Lugo, L. H. Fraser, B. Freedman, G. García-Salgado, J. R. Goheen, L. Guo, S. Husheer, M. Karembé, J. M. H. Knops, T. Kraaij, A. Kulmatiski, M. M. Kytöviita, F. Lezama, G. Loucougaray, A. Loydi, D. G. Milchunas, S. J. Milton, J. W. Morgan, C. Moxham, K. C. Nehring, H. Olf, T. M. Palmer, S. Rebollo, C. Riginos, A. C. Risch, M. Rueda, M. Sankaran, T. Sasaki, K. A. Schoenecker, N. L. Schultz, M. Schütz, A. Schwabe, F. Siebert, C. Smit, K. A. Stahlheber, C. Storm, D. J. Strong, J. Su, Y. V. Tiruvaimozhi, C. Tyler, J. Val, M. L. Vandegehuchte, K. E. Veblen, L. T. Vermeire, D. Ward, J. Wu, T. P. Young, Q. Yu, and T. J. Zelikova. 2018. Change in dominance determines herbivore effects on plant biodiversity. *Nature Ecology and Evolution* 2:1925–1932.
- Komatsu, K. J., M. L. Avolio, N. P. Lemoine, F. Isbell, E. Grman, G. R. Houseman, S. E. Koerner, D. S. Johnson, K. R. Wilcox, J. M. Alatalo, J. P. Anderson, R. Aerts, S. G. Baer, A. H. Baldwin, J. Bates, C. Beierkuhnlein, R. T. Belote, J. Blair, J. M. G. Bloor, P. J. Bohlen, E. W. Bork, E. H. Boughton, W. D. Bowman, A. J. Britton, J. F. Cahill, E. Chaneton, N. R. Chiariello, J. Cheng, S. L. Collins, J. H. C. Cornelissen, G. Du, A. Eskelinen, J. Firn, B. Foster, L. Gough, K. Gross, L. M. Hallett, X. Han, H. Harmens, M. J. Hovenden, A. Jagerbrand, A. Jentsch, C. Kern, K. Klanderud, A.

- K. Knapp, J. Kreyling, W. Li, Y. Luo, R. L. McCulley, J. R. McLaren, J. P. Megonigal, J. W. Morgan, V. Onipchenko, S. C. Pennings, J. S. Prevéy, J. N. Price, P. B. Reich, C. H. Robinson, F. L. Russell, O. E. Sala, E. W. Seabloom, M. D. Smith, N. A. Soudzilovskaia, L. Souza, K. Suding, K. B. Suttle, T. Svejcar, D. Tilman, P. Tognetti, R. Turkington, S. White, Z. Xu, L. Yahdjian, Q. Yu, P. Zhang, and Y. Zhang. 2019. Global change effects on plant communities are magnified by time and the number of global change factors imposed. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116:17867 LP – 17873.
- Lange, M., N. Eisenhauer, C. A. Sierra, H. Bessler, C. Engels, R. I. Griffiths, P. G. Mellado-Vázquez, A. A. Malik, J. Roy, S. Scheu, S. Steinbeiss, B. C. Thomson, S. E. Trumbore, and G. Gleixner. 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature Communications* 6.
- Lavado, R. S., and M. A. Taboada. 1987. Soil salinization as an effect of grazing in a native grassland soil in the Flooding Pampa of Argentina. *Soil. Use. and. Management.* 3:143–148.
- Leff, J. W., S. E. Jones, S. M. Prober, A. Barberán, E. T. Borer, J. L. Firn, W. S. Harpole, S. E. Hobbie, K. S. Hofmockel, J. M. H. Knops, R. L. McCulley, K. La Pierre, A. C. Risch, E. W. Seabloom, M. Schütz, C. Steenbock, C. J. Stevens, and N. Fierer. 2015. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:10967–72.
- Lemaire, G., J. Hodgson, A. Moraes, P. C. F. Carvalho, and C. Nabinger. 2000. *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*. CAB International.
- Lindsay, E. A., M. J. Colloff, N. L. Gibb, and S. A. Wakelin. 2010. The abundance of microbial functional genes in grassy woodlands is influenced more by soil nutrient

enrichment than by recent weed invasion or livestock exclusion. *Appl Environ Microbiol* 76:5547–5555.

López Zieher, X. M. 2014. Caracterización de las comunidades bacterianas del suelo en relictos de pastizal natural y lotes post-agrícolas de la Pampa Interior reveladas por metagenómica Intensificando : Ximena María López Zieher Director : Dra . Laura Yahdjian Codirector : Dra . L. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

López Zieher, X. M., L. Vivanco, and L. Yahdjian. 2020. Soil bacterial communities remain altered after 30 years of agriculture abandonment in Pampa grasslands. *Oecologia* 193:959–968.

López Zieher, X. M., L. Yahdjian, and L. Vivanco. 2015. A metagenomic survey of soil microbial communities in old fields dominated by exotic plant species and native remnant grasslands in the Inland Pampa , Argentina. Pages 1–2. *Eco Soc America*, Baltimore, USA.

Luo, J., S. B. Lindsey, and S. F. Ledgard. 2008. Nitrous oxide emissions from animal urine application on a New Zealand pasture. *Biology and Fertility of Soils* 44:463–470.

MA (Millennium Ecosystem Assessment) 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Page (I. Press, Ed.). Island Press, Washington, DC.

Maeda, K., S. Toyoda, R. Shimojima, T. Osada, D. Hanajima, R. Morioka, and N. Yoshida. 2010. Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of and amoA abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology* 76:1555–62.

Maestre, F. T., J. L. Quero, N. J. Gotelli, A. Escudero, V. Ochoa, M. Delgado-Baquerizo,

M. García-Gómez, M. A. Bowker, S. Soliveres, C. Escolar, P. García-Palacios, M. Berdugo, E. Valencia, B. Gozalo, A. Gallardo, L. Aguilera, T. Arredondo, J. Blones, B. Boeken, D. Bran, A. A. Conceição, O. Cabrera, M. Chaieb, M. Derak, D. J. Eldridge, C. I. Espinosa, A. Florentino, J. Gaitán, M. Gabriel Gatica, W. Ghiloufi, S. Gómez-González, J. R. Gutiérrez, R. M. Hernández, X. Huang, E. Huber-Sannwald, M. Jankju, M. Miriti, J. Monerris, R. L. Mau, E. Morici, K. Naseri, A. Ospina, V. Polo, A. Prina, E. Pucheta, D. A. Ramírez-Collantes, R. Romão, M. Tighe, C. Torres-Díaz, J. Val, J. P. Veiga, D. Wang, E. Zaady, M. G. Gatica, W. Ghiloufi, S. Gómez-González, J. R. Gutiérrez, R. M. Hernández, X. Huang, E. Huber-Sannwald, M. Jankju, M. Miriti, J. Monerris, R. L. Mau, E. Morici, K. Naseri, A. Ospina, V. Polo, A. Prina, E. Pucheta, D. A. Ramírez-Collantes, R. Romão, M. Tighe, C. Torres-Díaz, J. Val, J. P. Veiga, D. Wang, and E. Zaady. 2012. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global drylands. *Science* 335:214–218.

Manning, P., M. Saunders, R. D. Bardgett, M. Bonkowski, M. A. Bradford, R. J. Ellis, E. Kandeler, S. Marhan, and D. Tscherko. 2008. Direct and indirect effects of nitrogen deposition on litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 40:688–698.

Le Mer, J., and P. Roger. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37:25–50.

Milchunas, D. G., O. E. Sala, and W. K. Lauenroth. 1988. A generalized model of the effects of grazing by large herbivores on grassland community structure. *The American Naturalist* 132:87–106.

Millennium Ecosystem Assessment, and M. E. A. MA. 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Page (I. Press, Ed.). Island Press, Washington, DC.

Mosier, A., D. Schimel, D. Valentine, K. Bronson, and W. J. Parton. 1991. Methane and

nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* 350:330–332.

Mouillot, D., S. Villéger, M. Scherer-Lorenzen, and N. W. H. Mason. 2011. Functional structure of biological communities predicts ecosystem multifunctionality. *PloS one* 6:e17476.

Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54:655–670.

Navarro Blaya, S., and G. Navarro García. 2003. *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Mundi-Prensa.

Nemergut, D. R., C. C. Cleveland, W. R. Wieder, C. L. Washenberger, and A. R. Townsend. 2010. Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest. *Soil Biology and Biochemistry* 42:2153–2160.

Nemergut, D. R., E. K. Costello, M. Hamady, C. Lozupone, L. Jiang, S. K. Schmidt, N. Fierer, A. R. Townsend, C. C. Cleveland, L. Stanish, and R. Knight. 2011. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology* 13:135–144.

Nemergut, D. R., S. K. Schmidt, T. Fukami, S. P. O’Neill, T. M. Bilinski, L. F. Stanish, J. E. Knelman, J. L. Darcy, R. C. Lynch, P. Wickey, and S. Ferrenberg. 2013. Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77:342–356.

Nogueira, M. a., U. B. Albino, O. Brandão-Junior, G. Braun, M. F. Cruz, B. a. Dias, R. T. D. Duarte, N. M. R. Gioppo, P. Menna, J. M. Orlandi, M. P. Raimam, L. G. L. Rampazo, M. a. Santos, M. E. Z. Silva, F. P. Vieira, J. M. D. Torezan, M. Hungria,

- and G. Andrade. 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115:237–247.
- Oita, A., A. Malik, K. Kanemoto, A. Geschke, S. Nishijima, and M. Lenzen. 2016b. Erratum: Substantial nitrogen pollution embedded in international trade. *Nature Geoscience* 9:260.
- Overy, D. P., M. A. Bell, J. Habtewold, B. L. Helgason, and E. G. Gregorich. 2021. “Omics” Technologies for the Study of Soil Carbon Stabilization: A Review.
- Oyarzabal, M., J. M. Paruelo, F. del Pino, M. Oesterheld, and W. K. Lauenroth. 2008. Trait differences between grass species along a climatic in South and North America. *Journal of Vegetation Science* 19:183–192.
- Pace, N., D. Stahl, D. Lane, and G. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Advances in microbial ecology* 9.
- Parfitt, R. L., G. W. Yeates, D. J. Ross, N. L. Schon, A. D. Mackay, and D. A. Wardle. 2010. Effect of fertilizer, herbicide and grazing management of pastures on plant and soil communities. *Applied Soil Ecology* 45:175–186.
- Parkin, T. B., and R. T. Venterea. 2010. USDA-ARS GRACEnet Project Protocols Chapter 3. Chamber-Based Trace Gas Flux Measurements.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37:637–669.
- Patra, a. K., L. Abbadie, a. Clays-Josserand, V. Degrange, S. J. Grayston, P. Loiseau, F. Louault, S. Mahmood, S. Nazaret, L. Philippot, F. Poly, J. I. Prosser, a. Richaume, and X. Le Roux. 2005. Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs* 75:65–80.
- Paul, E. A., D. Harris, M. J. Klug, and R. W. Ruess. 1999. The Determination of Microbial

- Biomass. Pages 291–317 in G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, and P. Sollins, editors. *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. Oxford University Press, Oxford.
- Peco, B., E. Navarro, C. P. Carmona, N. G. Medina, and M. J. Marques. 2017. Effects of grazing abandonment on soil multifunctionality: The role of plant functional traits. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 249:215–225.
- Pennings, S. C., C. M. Clark, E. E. Cleland, S. L. Collins, L. Gough, K. L. Gross, D. G. Milchunas, and K. N. Suding. 2005. Do individual plant species show predictable responses to nitrogen addition across multiple experiments? *Oikos* 110:547–555.
- Perez, M. G., R. I. Romaniuk, V. R. N. Cosentino, M. Busto, F. A. González, M. A. Taboada, B. J. R. Alves, and A. O. Costantini. 2021. Winter soil N₂O emissions from a meat production system under direct grazing of Argentine Pampa. *Animal Production Science* 61:156–162.
- Philippot, L., A. Spor, C. Hénault, D. Bru, F. Bizouard, C. M. Jones, A. Sarr, and P.-A. Maron. 2013. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME journal* 7:1609–19.
- Piñeiro-Guerra, J. M., L. Yahdjian, T. Della Chiesa, and G. Piñeiro. 2019. Nitrous oxide emissions decrease with plant diversity but increase with grassland primary productivity. *Oecologia* 190:497–507.
- Piñeiro, G. 2006. *Biogeoquímica del carbono y nitrógeno en los pastizales pastoreados del Río de la Plata: Un análisis basado en modelos de simulación, sensores remotos y experimentos a campo*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias Escuela Para Graduados “Alberto Soriano” Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires.
- Portela, S. I., A. E. Andriulo, M. C. Sasal, B. Mary, and E. G. Jobbágy. 2006. Fertilizer

vs. organic matter contributions to nitrogen leaching in cropping systems of the Pampas: 15N application in field lysimeters. *Plant and Soil* 289:265–277.

Prashar, P., N. Kapoor, and S. Sachdeva. 2014. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 13:63–77.

Prober, S. M., J. W. Leff, S. T. Bates, E. T. Borer, J. Firn, W. S. Harpole, E. M. Lind, E. W. Seabloom, P. B. Adler, J. D. Bakker, E. E. Cleland, N. M. DeCrappeo, E. Delorenze, N. Hagenah, Y. Hautier, K. S. Hofmockel, K. P. Kirkman, J. M. H. Knops, K. J. La Pierre, A. S. MacDougall, R. L. Mcculley, C. E. Mitchell, A. C. Risch, M. Schuetz, C. J. Stevens, R. J. Williams, and N. Fierer. 2015. Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters* 18:85–95.

Van Raalte, C. D., I. Valiela, E. J. Carpenter, and J. M. Teal. 1974. Inhibition of nitrogen fixation in salt marshes measured by acetylene reduction. *Estuarine and Coastal Marine Science* 2:301–305.

Raison, R. J., M. J. Connell, and P. K. Khanna. 1987. Methodology for studying fluxes of soil mineral-N in situ. *Soil Biology & Biochemistry* 19:521–530.

Ramirez, K. S., J. M. Craine, and N. Fierer. 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. *Global Change Biology* 18:1918–1927.

Ramirez, K. S., C. L. Lauber, R. Knight, M. A. Bradford, and N. Fierer. 2010. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology* 91:3463–3470.

Rascovan, N., B. Carbonetto, S. Revale, M. D. Reinert, R. Alvarez, A. M. Godeas, R.

- Colombo, M. Aguilar, M. V. Novas, L. Iannone, A. M. Zelada, A. Pardo, G. Schrauf, A. Mentaberry, and M. P. Vazquez. 2013. The PAMPA datasets: a metagenomic survey of microbial communities in Argentinean pampean soils. *Microbiome* 1:1–6.
- Recavarren, P., C. Faverín, G. S. Cambareri, M. P. Tieri, and A. la Manna. 2021. Análisis y agrupamiento por indicadores de sistemas de producción de carne bovina en la Pampa Deprimida. *REVISTA ARGENTINA DE PRODUCCIÓN ANIMAL* 41:249–289.
- Reed, S. C., C. C. Cleveland, and A. R. Townsend. 2008. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. *Ecology* 89:2924–2934.
- Reed, S. C., C. C. Cleveland, and A. R. Townsend. 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42:489–512.
- Richardson, A. E., and R. J. Simpson. 2011. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology* 156:989–996.
- Risch, A. C., S. Zimmermann, B. Moser, M. Schütz, F. Hagedorn, J. Firn, P. A. Fay, P. B. Adler, L. A. Biederman, J. M. Blair, E. T. Borer, A. A. D. Broadbent, C. S. Brown, M. W. Cadotte, M. C. Caldeira, K. F. Davies, A. Virgilio, N. Eisenhauer, A. Eskelinen, J. M. H. Knops, A. S. MacDougall, R. L. McCulley, B. A. Melbourne, J. L. Moore, S. A. Power, S. M. Prober, E. W. Seabloom, J. Siebert, M. L. Silveira, K. L. Speziale, C. J. Stevens, P. M. Tognetti, R. Virtanen, L. Yahdjian, and R. Ochoa-Hueso. 2020. Global impacts of fertilization and herbivore removal on soil net nitrogen mineralization are modulated by local climate and soil properties. *Global Change Biology*:gcb.15308.
- Ritchie, M. E., and D. Tilman. 1995. Responses of Legumes to Herbivores and Nutrients During Succession on a Nitrogen-Poor Soil. *Ecology* 76:2648–2655.

- Robertson, G. P., D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, and P. Sollins. 1999a. *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. Oxford University Press, Oxford.
- Robertson, G. P., D. Wedin, P. M. Groffman, J. M. Blair, E. A. Holland, K. J. Nadelhoffer, and D. Harris. 1999b. Soil carbon and nitrogen availability: nitrogen mineralization, nitrification, and soil respiration potentials. Pages 258–271 in G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, and P. Sollins, editors. *Standard Soil Methods in Long-Term Ecological Research*. Oxford University Press on Demand, Oxford.
- Rodríguez, A. M., E. J. Jacobo, P. Scardaoni, and V. A. Deregibus. 2007. Effect of phosphate fertilization on flooding Pampa grasslands (Argentina). *Rangeland Ecology and Management* 60:471–478.
- Le Roux, X., M. Bardy, P. Loiseau, and F. Louault. 2003. Stimulation of soil nitrification and denitrification by grazing in grasslands: do changes in plant species composition matter? *Oecologia* 137:417–425.
- Rutter, S. 2006. Diet preference for grass and legumes in free-ranging domestic sheep and cattle: current theory and future application. *Applied Animal Behaviour Science*.
- Sala, O. E., and A. Austin. 2000. Methods of estimating aboveground net primary productivity. Pages 31–43 in O. E. Sala, R. B. Jackson, H. A. Mooney, and R. H. Howarth, editors. *Methods in Ecosystem Science*. Springer, New York.
- Sala, O. E., M. Oesterheld, R. J. C. Leon, A. Soriano, R. León, and A. Soriano. 1986. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Vegetatio*. 67:27–32.
- Sala, O. E., L. Yahdjian, K. Havstad, and M. R. Aguiar. 2017. *Rangeland Ecosystem Services: Nature's Supply and Humans' Demand*. Pages 467–489 *Series on Environmental Management*. Springer.

- Sanchez-Martin, L., A. Sanz-Cobena, A. Meijide, M. Quemada, and A. Vallejo. 2010. The importance of the fallow period for N₂O and CH₄ fluxes and nitrate leaching in a Mediterranean irrigated agroecosystem. *European Journal of Soil Science* 61:710–720.
- Salvagiotti, F., K. G. Cassman, J. E. Specht, D. T. Walters, A. Weiss, and A. Dobermann. 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 108:1–13.
- Schimel, J. P., R. G. Cates, and R. Ruess. 1998. The Role of Balsam Poplar Secondary Chemicals in Controlling Soil Nutrient Dynamics through Succession in the Alaskan Taiga. *Biogeochemistry* 42:221–234.
- Semmartin, M. M., M. OYARZABAL, J. LORETI, and M. M. Oesterheld. 2007. Controls of primary productivity and nutrient cycling in a temperate grassland with year-round production. *Austral Ecology* 32:416–428.
- Setiawati, T. C., and L. Mutmainnah. 2016. Solubilization of Potassium Containing Mineral by Microorganisms From Sugarcane Rhizosphere. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9:108–117.
- Singh, B. K., C. Quince, C. a. Macdonald, A. Khachane, N. Thomas, W. A. Al-Soud, S. J. Sørensen, Z. He, D. White, A. Sinclair, B. Crooks, J. Zhou, and C. D. Campbell. 2014. Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. *Environmental Microbiology* 16:2408–2420.
- Sitters, J., E. R. J. Wubs, E. S. Bakker, T. W. Crowther, P. B. Adler, S. Bagchi, J. D. Bakker, L. Biederman, E. T. Borer, E. E. Cleland, N. Eisenhauer, J. Firm, L. Gherardi, N. Hagenah, Y. Hautier, S. E. Hobbie, J. M. H. Knops, A. S. MacDougall, R. L. McCulley, J. L. Moore, B. Mortensen, P. L. Peri, S. M. Prober, C. Riggs, A. C. Risch, M. Schütz, E. W. Seabloom, J. Siebert, C. J. Stevens, and G. F. (Ciska)

- Veen. 2020. Nutrient availability controls the impact of mammalian herbivores on soil carbon and nitrogen pools in grasslands. *Global Change Biology* 26:2060–2071.
- Smercina, D. N., S. E. Evans, M. L. Friesen, and L. K. Tiemann. 2019, March 1. To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *American Society for Microbiology*.
- Smouse, P. E., J. C. Long, and R. R. Sokal. 1986. Multiple Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. *Systematic Zoology* 35:627–632.
- Soper, F. M., C. Simon, and V. Jauss. 2021. Measuring nitrogen fixation by the acetylene reduction assay (ARA): is 3 the magic ratio? *Biogeochemistry* 152:345–351.
- Soriano, A., and O. E. Sala. 1986. Emergence and survival of *Bromus setifolius* seedlings in different microsites of a patagonian arid steppe. *Israel Journal of Botany*. 35:91–100.
- Spirito, F., L. Yahdjian, P. M. Tognetti, and E. J. Chaneton. 2014. Soil ecosystem function under native and exotic plant assemblages as alternative states of successional grasslands. *Acta Oecologica* 54:4–12.
- Stevens, C. J., E. M. Lind, Y. Hautier, W. S. Harpole, E. T. Borer, S. Hobbie, E. W. Seabloom, L. Ladwig, J. D. Bakker, C. Chu, S. Collins, K. F. Davies, J. Firn, H. Hillebrand, K. J. la Pierre, A. MacDougall, B. Melbourne, R. L. McCulley, J. Morgan, J. L. Orrock, S. M. Prober, A. C. Risch, M. Schuetz, and P. D. Wragg. 2015. Anthropogenic nitrogen deposition predicts local grassland primary production worldwide. *Ecology* 96:1459–1465.
- Strickland, M. S., C. L. Lauber, N. Fierer, and M. a Bradford. 2009. Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90:441–451.
- Suding, K. N., S. L. Collins, L. Gough, C. Clark, E. E. Cleland, K. L. Gross, D. G.

- Milchunas, and S. Pennings. 2005. Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization.
- Sun, J., M. Liu, B. Fu, D. Kemp, W. Zhao, G. Liu, G. Han, A. Wilkes, X. Lu, Y. Chen, G. Cheng, T. Zhou, G. Hou, T. Zhan, F. Peng, H. Shang, M. Xu, P. Shi, Y. He, M. Li, J. Wang, A. Tsunekawa, H. Zhou, Y. Liu, Y. Li, and S. Liu. 2020. Reconsidering the efficiency of grazing exclusion using fences on the Tibetan Plateau. *Science Bulletin* 65:1405–1414.
- Tedersoo, L., M. Bahram, S. Pöhlme, U. Kõljalg, N. S. Yorou, R. Wijesundera, L. V. Ruiz, A. M. Vasco-Palacios, P. Q. Thu, A. Suija, M. E. Smith, C. Sharp, E. Saluveer, A. Saitta, M. Rosas, T. Riit, D. Ratkowsky, K. Pritsch, K. Põldmaa, M. Piepenbring, C. Phosri, M. Peterson, K. Parts, K. Pärtel, E. Otsing, E. Nouhra, A. L. Njouonkou, R. H. Nilsson, L. N. Morgado, J. Mayor, T. W. May, L. Majuakim, D. J. Lodge, S. S. Lee, K.-H. Larsson, P. Kohout, K. Hosaka, I. Hiiesalu, T. W. Henkel, H. Harend, L. Guo, A. Greslebin, G. Grelet, J. Geml, G. Gates, W. Dunstan, C. Dunk, R. Drenkhan, J. Dearnaley, A. De Kesel, T. Dang, X. Chen, F. Buegger, F. Q. Brearley, G. Bonito, S. Anslan, S. Abell, and K. Abarenkov. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1256688.
- Terry, R. E., R. Tate III, and J. M. Duxbury. 1981. The effect of flooding on nitrous oxide emissions from an organic soil. *Soil. Science.* 132:228–232.
- Tian, H., R. Xu, J. G. Canadell, R. L. Thompson, W. Winiwarter, P. Suntharalingam, E. A. Davidson, P. Ciais, R. B. Jackson, G. Janssens-Maenhout, M. J. Prather, P. Regnier, N. Pan, S. Pan, G. P. Peters, H. Shi, F. N. Tubiello, S. Zaehle, F. Zhou, A. Arneth, G. Battaglia, S. Berthet, L. Bopp, A. F. Bouwman, E. T. Buitenhuis, J. Chang, M. P. Chipperfield, S. R. S. Dangal, E. Dlugokencky, J. W. Elkins, B. D. Eyre, B. Fu, B. Hall, A. Ito, F. Joos, P. B. Krummel, A. Landolfi, G. G. Laruelle, R.

- Lauerwald, W. Li, S. Lienert, T. Maavara, M. MacLeod, D. B. Millet, S. Olin, P. K. Patra, R. G. Prinn, P. A. Raymond, D. J. Ruiz, G. R. van der Werf, N. Vuichard, J. Wang, R. F. Weiss, K. C. Wells, C. Wilson, J. Yang, and Y. Yao. 2020. A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature* 586:248–256.
- Tilman, D., C. Balzer, J. Hill, and B. L. Befort. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Tilman, D., K. G. Cassman, P. A. Matson, R. Naylor, and S. Polasky. 2002. Agricultural sustainability and intense production practices. *Nature* 418:671–677.
- Tognetti, P. M., S. M. Prober, S. Báez, E. J. Chaneton, J. Firn, A. C. Risch, M. Schuetz, A. K. Simonsen, L. Yahdjian, E. T. Borer, E. W. Seabloom, C. A. Arnillas, J. D. Bakker, C. S. Brown, M. W. Cadotte, M. C. Caldeira, P. Daleo, J. M. Dwyer, P. A. Fay, L. A. Gherardi, N. Hagenah, Y. Hautier, K. J. Komatsu, R. L. McCulley, J. N. Price, R. J. Standish, C. J. Stevens, P. D. Wragg, and M. Sankaran. 2021. Negative effects of nitrogen override positive effects of phosphorus on grassland legumes worldwide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118:e2023718118.
- Treseder, K. K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist* 164:347–355.
- Treseder, K. K. 2008. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters* 11:1111–1120.
- Viglizzo, E. F., F. C. Frank, L. V. Carreño, E. G. Jobbágy, H. Pereyra, J. Clatt, D. Pincén, and M. F. Ricard. 2011. Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Global Change Biology* 17:959–973.
- Vitousek, P. M., J. D. Aber, R. W. Howarth, G. E. Likens, P. A. Matson, D. W. Schindler,

- W. H. Schlesinger, and D. Tilman. 1997a. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7:737–750.
- Vitousek, P. M., and D. U. Hooper. 1993. Biological diversity and terrestrial ecosystem biogeochemistry. Pages 3–14 *in* E. D. Schulze and H. A. Mooney, editors. *Biodiversity and ecosystem function*. Springer-Verlag, Berlin.
- Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco, and J. M. Melillo. 1997b. Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science* 277.
- Vos, M., A. B. Wolf, S. J. Jennings, and G. a. Kowalchuk. 2013. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiology Reviews* 37:936–954.
- Walters, K. E., and J. B. H. Martiny. 2020. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLOS ONE* 15:e0233872.
- Wang, C., D. Liu, and E. Bai. 2018. Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry* 120:126–133.
- Wang, R., Y. Balkanski, O. Boucher, P. Ciais, J. Peñuelas, and S. Tao. 2015. Significant contribution of combustion-related emissions to the atmospheric phosphorus budget. *Nature Geoscience* 8:48–54.
- Wardle, D. a. 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology Letters* 9:870–886.
- Wilson, G. W. T., C. W. Rice, M. C. Rillig, A. Springer, and D. C. Hartnett. 2009. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: Results from long-term field experiments. *Ecology Letters* 12:452–461.
- Wolf, B., X. Zheng, N. Brüggemann, W. Chen, M. Dannenmann, X. Han, M. A. Sutton, H. Wu, Z. Yao, K. Butterbach-Bahl, B. Wolf, X. Zheng, N. Bru, M. A. Sutton, H.

- Wu, Z. Yao, and K. Butterbach-Bahl. 2010. Grazing-induced reduction of natural nitrous oxide release from continental steppe. *Nature* 464:881–884.
- Wolfe, B. E., and J. N. Klironomos. 2005. Breaking New Ground: Soil Communities and Exotic Plant Invasion. *BioScience* 55:477–487.
- Wu, X., Z. Li, B. Fu, W. Zhou, H. Liu, and G. Liu. 2014. Restoration of ecosystem carbon and nitrogen storage and microbial biomass after grazing exclusion in semi-arid grasslands of Inner Mongolia. *Ecological Engineering* 73:395–403.
- Xia, J., and S. Wan. 2008. Global response patterns of terrestrial plant species to nitrogen addition. *New Phytologist* 179:428–439.
- Yahdjian, L., P. M. Tognetti, and E. J. Chaneton. 2017. Plant functional composition affects soil processes in novel successional grasslands. *Functional Ecology*.
- Zavaleta, E. S., J. R. Pasari, K. B. Hulvey, and G. D. Tilman. 2010. Sustaining multiple ecosystem functions in grassland communities requires higher biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:1443–1446.
- Zhou, G., X. Zhou, Y. He, J. Shao, Z. Hu, R. Liu, H. Zhou, and S. Hosseinibai. 2016. Grazing intensity significantly affects belowground carbon and nitrogen cycling in grassland ecosystems: A meta-analysis. *Global Change Biology* 23:1167–1179.
- Zhu, Z., J. Zhou, M. Shahbaz, H. Tang, S. Liu, W. Zhang, H. Yuan, P. Zhou, H. Alharbi, J. Wu, Y. Kuzyakov, and T. Ge. 2021. Microorganisms maintain C:N stoichiometric balance by regulating the priming effect in long-term fertilized soils. *Applied Soil Ecology* 167:104033.

APENDICE A- CAPITULO 2

Cuadro A1. Lista de los 20 principales géneros de bacterias. En color rojo se marca los que mostraron diferencias significativas, y su valor de p para el tratamiento fertilización figura en la última columna.

Los 20 más abundantes géneros de bacterias	O_PAST	O_CLAU	NPK_P AST	NPK_C LAU	p para fertilización
d__Bacteria;p__Verrucomicrobiota;c__Verrucomicrobiae;o__Pedosphaerales;f__Pedosphaeraeae;g__uncultured	2049	1859	1852	1615	
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Thermoleophilia;o__Gaiellales;f__uncultured;g__uncultured	1480	878	1523	1523	
d__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Bacillaceae;g__Bacillus	1174	927	735	1860	
d__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Sutterellaceae;g__Sutterella	1283	1281	1204	757	0.045
d__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhizobiales;f__Xanthobacteraceae;g__uncultured	1044	957	921	1221	
d__Bacteria;p__Chloroflexi;c__KD4-96;o__KD4-96;f__KD4-96;g__KD4-96	844	693	1380	1016	0.041
d__Bacteria;p__Firmicutes;__;__;__	1146	1210	783	784	0.0041
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;__;__;__	1021	601	991	978	
d__Bacteria;p__Acidobacteriota;c__Acidobacteriae;o__Acidobacteriales;f__uncultured;g__uncultured	674	615	769	626	
d__Bacteria;p__Bacteroidota;c__Bacteroidia;o__Chitinophagales;f__Chitinophagaceae;g__Flavisolibacter	595	521	617	609	
d__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;__;__;__	558	677	429	519	
d__Bacteria;p__Acidobacteriota;c__Acidobacteriae;o__Acidobacteriales;f__Acidobacteriaceae_(Subgroup_1);__	505	526	500	492	
d__Bacteria;p__Acidobacteriota;c__Acidobacteriae;o__Solibacterales;f__Solibacteraceae;g__Candidatus_Solibacter	547	610	460	391	0.048
d__Bacteria;p__Planctomycetota;c__Planctomycetes;o__Gemmatales;f__Gemmataceae;g__uncultured	572	705	358	309	<0.0001
d__Bacteria;p__Planctomycetota;c__Planctomycetes;o__Pirellulales;f__Pirellulaceae;g__Blastopirellula	509	531	435	458	
d__Bacteria;p__Planctomycetota;c__Phycisphaerae;o__Tepidisphaerales;f__WD2101_soil_group;g__WD2101_soil_group	472	526	543	329	

d__Bacteria;p__Gemmatimonadota;c__Gemmatimonadetes;o__Gemmatimonadales;f__Gemmatimonadaceae;g__uncultured	441	522	394	358
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;o__Micromonosporales;f__Micromonosporaceae;g__Micromonospora	282	337	440	637
d__Bacteria;p__Actinobacteriota;c__Actinobacteria;__;__;__	483	279	461	404

APENDICE B – CAPITULO 3

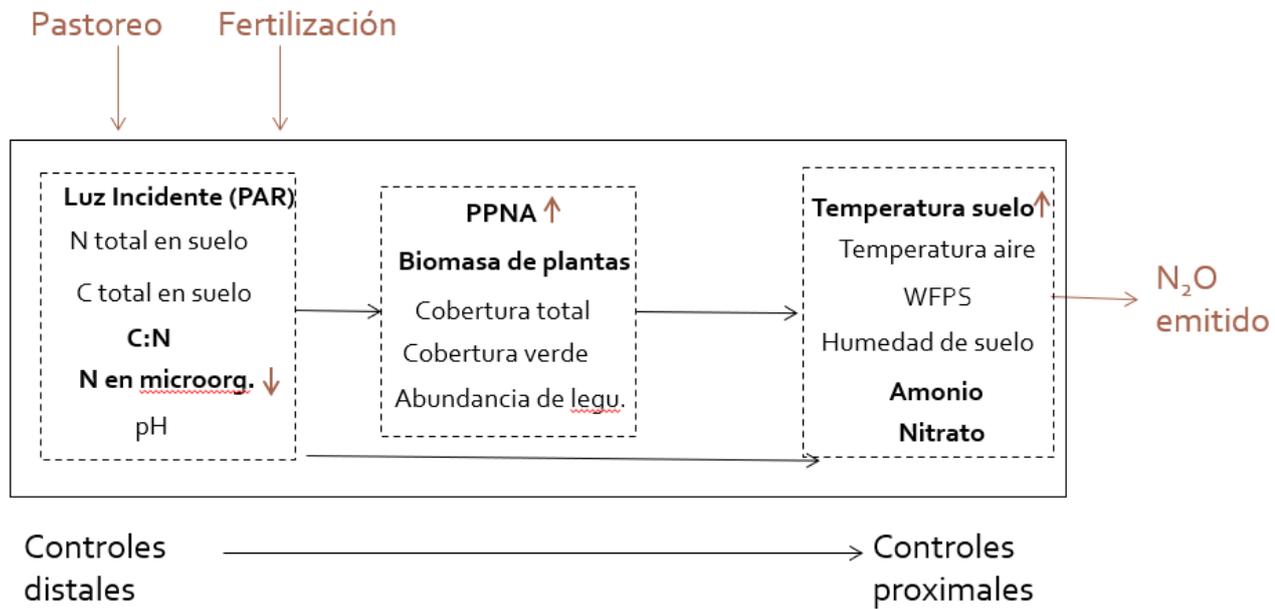


Figura B1. Impulsores proximales y distales que controlan las emisiones de óxido nitroso y la fijación biológica de nitrógeno (adaptado de Stuart Chapin et al., 2012).

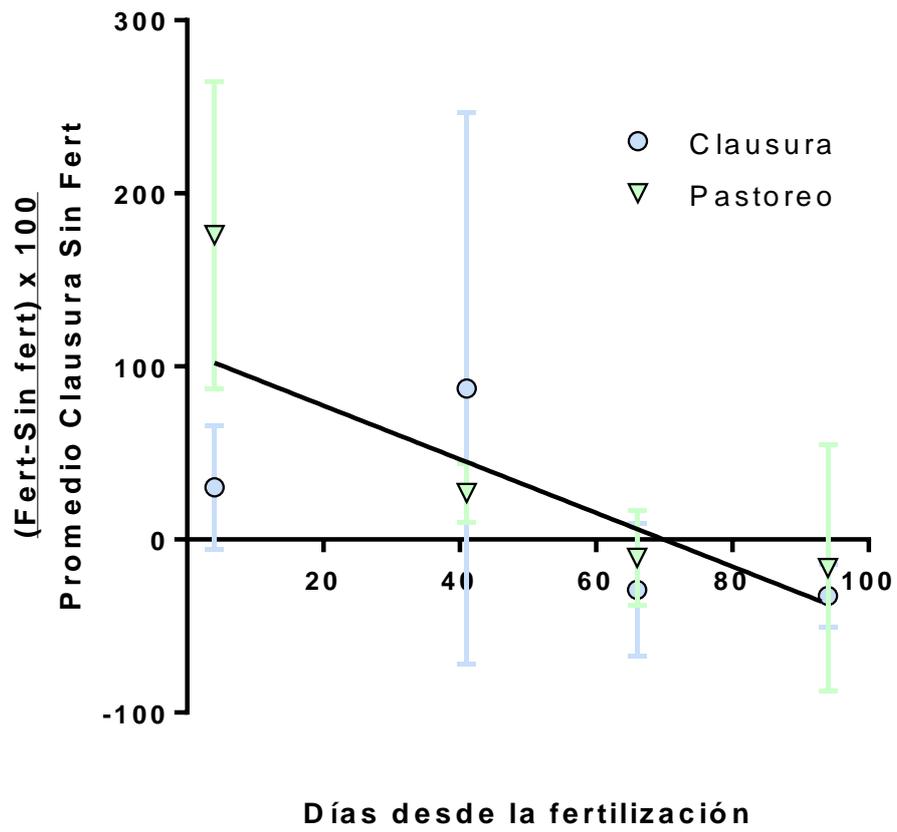


Figura B2. Intervalos de confianza para la relación de respuesta de las emisiones de óxido nítrico relacionadas con los días desde la fertilización en parcelas de clausura y en pastoreo.

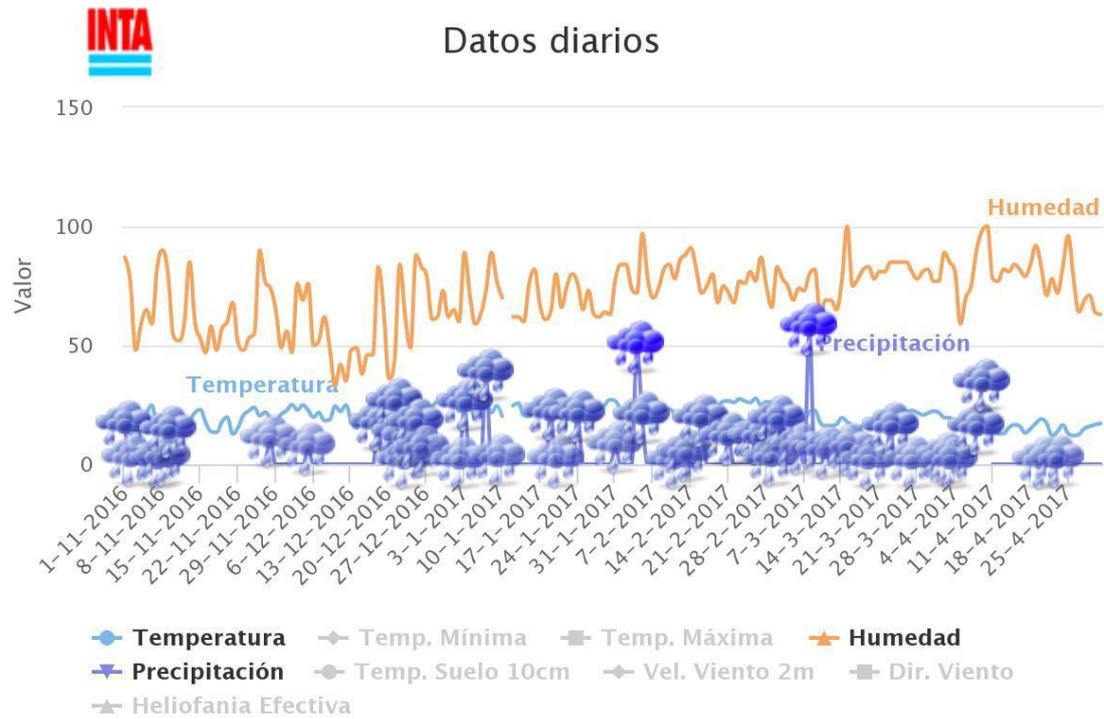


Figura B3. Precipitaciones, temperatura de abrigo y humedad relativa en la EEA Chascomús desde el 1 de noviembre de 2016 al 1 de mayo de 2017.

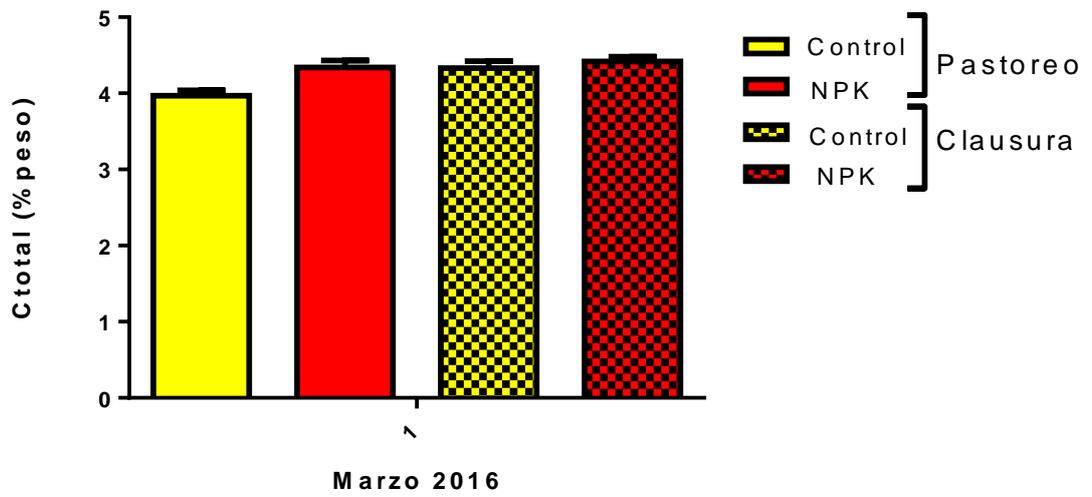


Figura B4. Carbono total (% peso) de suelo medido de 0 a 10 cm de profundidad. No hubo diferencias significativas.

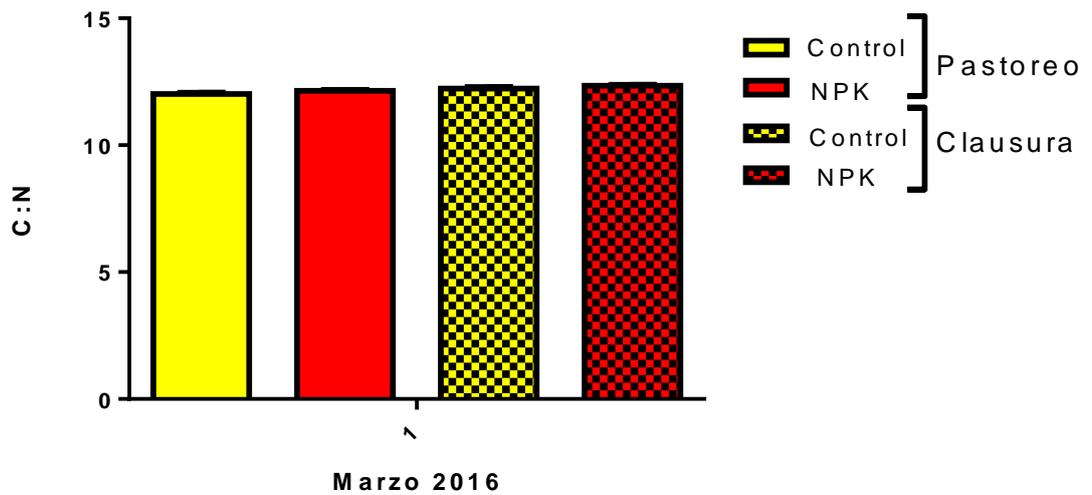


Figura B5. Relación C:N de suelo medido de 0 a 10 cm de profundidad. No hubo diferencias significativas.

APENDICE C – CAPITULO 4

Figura C1. Aproximación de múltiples umbrales (máxima 7, valores más altos usando 20, 40, 60 y 80% de límite en los umbrales)

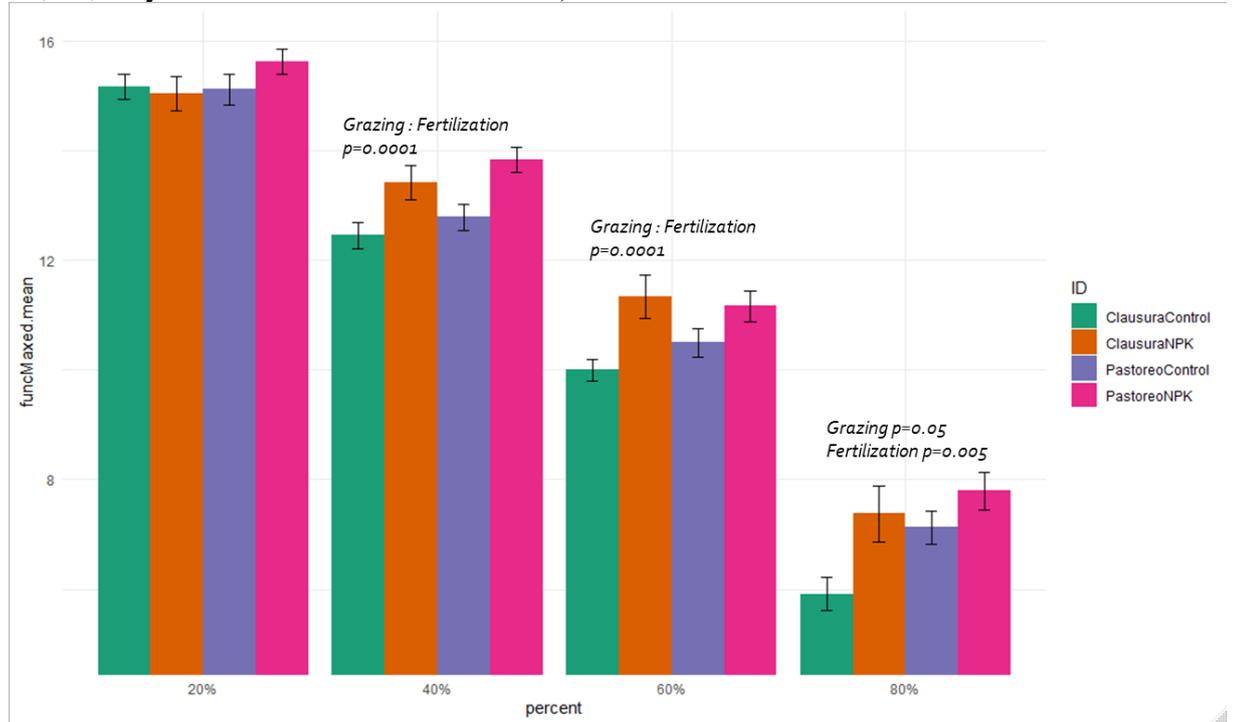


Figura C2. Estudio de sesgo en el cálculo de los índices de multifuncionalidad S (panel de arriba) y M (panel de abajo) en función del número de funciones consideradas. Se consideró el efecto de una reducción en el 50% de las funciones utilizadas seleccionadas al azar entre las 18 funciones incluidas en los índices.

