

**CAMBIOS EN LA PROPORCIÓN DE ESPECIES C₃/C₄ EN PASTIZALES
NATURALES Y SUS EFECTOS SOBRE LA MINERALIZACION POTENCIAL DE
NITRÓGENO Y LOS NIVELES DE $\delta^{15}\text{N}$**

Francisco Murray

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
MAGISTER SCIENTIAE en Producción Animal

Área de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Balcarce, Argentina

Junio de 2009

**CAMBIOS EN LA PROPORCIÓN DE ESPECIES C₃/C₄ EN PASTIZALES
NATURALES Y SUS EFECTOS SOBRE LA MINERALIZACION POTENCIAL DE
NITRÓGENO Y LOS NIVELES DE $\delta^{15}\text{N}$.**

Francisco Murray

Fernando A. Lattanzi, Ing. Agr., Mg. Sc., PhD.
Director de Tesis

Cecilia Videla, Ing. Agr. Mg. Sc., Dr.
Co-directora de Tesis

**CAMBIOS EN LA PROPORCIÓN DE ESPECIES C₃/C₄ EN PASTIZALES
NATURALES Y SUS EFECTOS SOBRE LA MINERALIZACION POTENCIAL DE
NITRÓGENO Y LOS NIVELES DE $\delta^{15}\text{N}$.**

Francisco Murray

Aprobada por:

Claire Chenou, Ing. Cs. Nat., PhD.
Evaluadora

Esteban Jobaggy, Ing. Agr., PhD.
Evaluador

Gervasio Piñeiro, Ing. Agr., Dr.
Evaluador

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer especialmente a todos los que aportaron para que el tiempo y el esfuerzo puesto en esta maestría, haya sido para mí una muy buena experiencia, tanto en lo que tuvo que ver con la temática de trabajo y formas de analizar información, como en el aspecto personal.

A Fernando y Cecilia por el esfuerzo, dedicación y paciencia puesta en mi proceso de aprendizaje, y por el buen humor y trato llano que los caracteriza. También a Germán por hacer el aguante tanto desde las ideas, como amigo y compañero de oficina, viajes de muestreo, cervezas, etcéteras. Realmente me sentí muy cómodo y pasé muy buenos momentos como parte del “isótopos team”.

A Enrique Viviani Rossi, por la insistencia puesta en que haga el postgrado en Balcarce y a Mónica Agnusdei por haberme conectado con Fernando y dado la oportunidad de trabajar en el grupo de pasturas, además de estar siempre pendiente.

A Marita, nuestra secretaria del postgrado y sommelier, por la buena onda que le pone al chinchorro y por su amistad. A Jorgelina y Pato, por hacerme un lugar en la oficina y desmitificar de entrada la solemnidad del postgrado con su muy buena onda. A los integrantes de la nunca bien ponderada oficina megasolution, Nico, Ventro, Fer, Feli y Mariano, y demás integrantes del chincho, Gabi, Julia, Juliana, Veronica y Mercedes; por el rocknroll, los mates, ser fuente de consultas y buen humor.

A los cumpas de cursada, Pome, Adri, Renegado, Carliño, Pablo, Demián, devenidos con el tiempo en muy buenos amigos, compañeros de (intentos de) navegación, caminatas, asados, futbol, etc., en definitiva, del lado divertido de la vida. Y a los que fui conociendo despues, Carlos, Roxi, Hipo, Tano, Cecilia, Valeria, Peter y Jorge. También a los cumpas “vegetales”, especialmente a Fede, Ana, Juan Manuel, Lorena y Andrea.

A los compañeros de convivencia, Vero, Pacho, la gran familia casinesca: Sil, Flor, Mike, Martín, La Negra, Minilaura, Edu, Ernesto, Laura y Romina; y en el aguante final, Adri y Braulio, mi gran amigo personal; por los muy buenos momentos compartidos.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1 <i>Ciclo del nitrógeno en pastizales pastoreados.....</i>	3
2.1.1 Rol del animal en pastoreo:	3
2.2 <i>Rol de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en el ciclado de nitrógeno</i>	4
2.3 <i>El manejo de promoción de especies invernales en pastizales del Río de la Plata.....</i>	6
2.4 <i>$\delta^{13}\text{C}$ y biomasa C_3 y C_4.....</i>	7
2.5 <i>Nitrógeno Potencialmente Mineralizable</i>	8
2.6 <i>$\delta^{15}\text{N}$ como indicador de pérdidas de nitrógeno.....</i>	9
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	10
3.1 <i>Objetivos</i>	10
3.2 <i>Hipótesis</i>	10
4. MATERIALES Y METODOS	11
4.1 <i>Situaciones de manejo muestreadas.....</i>	11
4.1.1 <i>Pastizal natural (control)</i>	11
4.1.2 <i>Promoción de gramíneas invernales (C_3) basada en la aplicación de herbicidas.....</i>	11
4.1.3 <i>Promoción de gramíneas invernales (C_3) y fertilización con nitrógeno</i>	12
4.1.4 <i>Promoción de leguminosas, sin aplicación de herbicidas</i>	12
4.2 <i>Área de estudio: criterios de selección de situaciones y sitios de muestreo.....</i>	12
4.3 <i>Recolección y acondicionamiento de las muestras de suelo</i>	16
4.4 <i>Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo</i>	16
4.5 <i>Variables analizadas en las muestras de suelo.....</i>	18
4.5.1 <i>Textura</i>	18
4.5.2 <i>pH.....</i>	18
4.5.3 <i>Contenido y composición isotópica de carbono y nitrógeno.....</i>	19
4.5.4 <i>Nitrógeno Potencialmente Mineralizable.....</i>	19
4.6 <i>Análisis estadístico.....</i>	20
4.7 <i>Interferencias por prácticas de manejo desconocidas, condiciones iniciales de sitios promocionados y efectos secundarios de la promoción.....</i>	21

5. RESULTADOS	24
5.1 $\delta^{13}\text{C}$ y proporción de carbono derivado de especies C_3	24
5.2 Relación C/N	26
5.3 Nitrógeno potencialmente mineralizable.....	28
5.4 $\delta^{15}\text{N}$	29
5.5 Tamaño de los pools de materia orgánica.....	31
5.5.1 Carbono.....	31
5.5.2 Nitrógeno.....	33
5.5.3 Relación entre nitrógeno potencialmente mineralizable y la cantidad de carbono y nitrógeno en la materia orgánica particulada	33
6. DISCUSIÓN	36
6.1 Aumentos en la proporción de especies C_3 están asociados a mejoras en la calidad del material vegetal que entra al suelo.....	37
6.2 Aumentos en la proporción de especies C_3 no están asociados con aumentos en Nitrógeno potencialmente de mineralizable	39
6.2.1 Posibles causas de disminución de MOP_C	41
6.3 Aumentos en la proporción de especies C_3 están asociados a aumentos en ^{15}N , y posiblemente a incrementos en la proporción de nitrógeno volatilizado	43
7. CONCLUSIONES	45
8. BIBLIOGRAFÍA	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características edáficas y climáticas de los 11 sitios muestreados, ordenados por región y latitud.	14
Cuadro 2: Principales características de las promociones muestreadas.....	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de los 11 sitios de muestreo utilizados para realizar comparaciones entre promoción y su respectivo control apareado. En el sitio 10 se muestrearon dos promociones comparadas con un control común. En color gris se muestra la extensión original del pastizal natural del Río de la Plata (Soriano, 1991), con líneas punteadas las isohietas de 500 y 1000 mm, y con líneas continuas las isotermas de 15 y 20 °C.....	13
Figura 2: esquema muestreo y tratamiento en las muestras de suelo para la obtención de las principales variables analizadas.....	18
Figura 3: a) $\delta^{13}\text{C}$ y b) $\delta^{15}\text{N}$ en materia orgánica asociada a minerales de 0-5 cm de profundidad, en promoción y en pastizal natural control. La línea de puntos indica la relación 1:1.....	22
Figura 4: Porcentaje de arena de 0 a 5 cm de profundidad en promoción y pastizal natural control. Corresponde a la suma del peso de las fracciones $\text{MOP}_{200-2000}$ pesada y MOP_{53-200} , dividido por el peso total del suelo fraccionado ($\text{g g}^{-1} \cdot 100$). Cada punto representa una promoción-control apareada. La línea punteada indica la relación 1:1.....	22
Figura 5: Densidad aparente (Dap) de 0-5 cm y de 5-10 cm de profundidad, en promoción y en pastizal natural control. Cada punto representa un sitio muestreado. La línea de puntos indica la relación 1:1.....	23
Figura 6: Valor de $\delta^{13}\text{C}$ y proporción de carbono de origen C_3 ($\% \text{C-C}_3$) en la materia orgánica particulada gruesa ($\text{MOP}_{2000-200}$) del suelo de 0-5 cm, producto del manejo de promoción de especies invernales respecto a pastizales naturales control, para cada sitio muestreado. Los sitios se hallan ordenados de norte a sur.....	25
Figura 7: Relación entre la tasa logarítmica de recambio anual de carbono derivado de vegetación C_3 ($\% \text{C-C}_3$) y el producto de la temperatura por la precipitación, para la materia orgánica del suelo de 0-5 cm fraccionada por tamaño en particulada gruesa ($\text{MOP}_{2000-200}$), particulada fina (MOP_{200-53}) y asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado. Se utilizaron tasas logarítmicas de cambio anual debido a la distinta antigüedad de la promoción en cada sitio. El parámetro “temperatura x precipitación” aumenta con la latitud, por lo que los sitios se hallan ordenados de sur a norte.....	25

- Figura 8:** Relación C/N para la fracción de materia orgánica a) particulada gruesa ($MOP_{200-2000}$) y b) asociada a minerales (MOAM) para suelo de 0-5 cm perteneciente a pastizales naturales control y a lotes bajo manejo de promoción de especies invernales, ordenados por sitio. La fracción particulada fina (MOP_{53-200}), con un comportamiento intermedio a las otras dos, no fue graficada con el objetivo de simplificar la visualización de la figura. 26
- Figura 9:** Diferencia en la relación C/N en función de la diferencia en carbono de origen C_3 ($\Delta \%C-C_3$) en promoción respecto a pastizal natural control, para materia orgánica de 0-5 cm, fraccionada por tamaño en particulada gruesa ($MOP_{2000-200}$) particulada fina (MOP_{200-53}) y asociada a minerales (MOAM). ($\Delta C/N$: C/N promoción – C/N control. Valores negativos indican que la relación C/N es menor en la promoción)..... 27
- Figura 10:** Diferencia en la relación C/N por unidad porcentual de cambio en la proporción de carbono C_3 ($\Delta C/N / \Delta \%C-C_3$) en promoción respecto a pastizal natural control, en función de la cantidad de nitrógeno aplicado. Se diferencia para las tres fracciones en que se separó por tamaño la materia orgánica del suelo de 0-5 cm. ($\Delta C/N / \Delta \%C-C_3 = (C/N$ promoción – C/N control)/($\%C-C_3$ promoción - $\%C-C_3$ control). Valores negativos indican que la relación C/N es menor en la promoción)..... 28
- Figura 11:** Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) en suelo de 0-5 cm de promoción y pastizal natural control, para cada sitio muestreado..... 29
- Figura 12:** Composición isotópica del nitrógeno ($\delta^{15}N$) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las fracciones separadas por tamaño, (a) particulada gruesa ($MOP_{2000-53}$) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado. 30
- Figura 13:** Cambio en el contenido del isótopo ^{15}N ($\Delta \delta^{15}N$) en función de la cantidad total de nitrógeno agregado ($kg N ha^{-1}$) en promoción respecto a pastizal natural control, para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada por tamaño en particulada gruesa ($MOP_{2000-200}$), particulada fina (MOP_{200-53}) y asociada a minerales (MOAM). ($\Delta \delta^{15}N = \delta^{15}N$ promoción - $\delta^{15}N$ control. Valores positivos indican que el valor de $\delta^{15}N$ es mayor en la promoción). 31
- Figura 14:** Contenido de carbono ($g C kg^{-1} suelo^{-1}$) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las

- fracciones separadas por tamaño: (a) particulada gruesa ($MOP_{2000-53}$) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado..... 32
- Figura 15:** Contenido de nitrógeno (g N/ kg suelo) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las fracciones separadas por tamaño: (a) particulada gruesa ($MOP_{2000-53}$) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado..... 33
- Figura 16:** nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) en función de la cantidad de carbono (**a** y **c**) o cantidad de nitrógeno (**b** y **d**) para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada en particulada ($MOP_{53-2000}$) y asociada a minerales (MOAM). En cada caso se trazó una regresión potencial sobre el total de los puntos (**a**: $p < 0,001$, $R^2 = 0,62$ **b**: $p < 0,001$, $R^2 = 0,64$; **c**: $p = 0,3979$, $R^2 = 0,018$; **d**: $p = 0,0496$, $R^2 = 0,093$). Cada punto corresponde a un lote muestreado, diferenciado por situación de manejo (promoción o control) y región (litoral o bonaerense)..... 34
- Figura 17:** Cambio relativo de nitrógeno potencialmente mineralizable (%R NPM) en función de la diferencia relativa en la cantidad de a) carbono (%R g Carbono kg^{-1} suelo $^{-1}$) y b) nitrógeno (%R g Nitrógeno kg^{-1} suelo $^{-1}$) de las promociones respecto al pastizal control, para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada en particulada ($MOP_{53-2000}$) y asociada a minerales (MOAM). 34
- Figura 18:** Cambios relativos promedio (R) \pm error estándar para $\delta^{13}C$, C/N, NPM y $\delta^{15}N$, para materia orgánica total (MO total) de 0-5 cm y fraccionada por tamaño en particulada ($MOP_{2000-53}$) y asociada a minerales (MOAM), para la región a) litoral y b) bonaerense. (R = (promoción - control)/ control. Un valor negativo indica menor valor de la variable en promoción). 37

RESUMEN

El ciclado de nitrógeno es especialmente complejo en pastizales pastoreados ya que incluye especies con ciclos de producción contrastantes, leguminosas fijadoras de nitrógeno, e involucra la ingesta de forraje por parte de rumiantes y la consecuente deposición de heces y orina. En este trabajo se analizó la relación entre cambios en la proporción de especies C_3/C_4 en pastizales naturales del Río de la Plata y dos aspectos del ciclado de nitrógeno: la capacidad potencial de mineralizar nitrógeno y el contenido del isótopo ^{15}N , un indicador de la importancia de pérdidas de nitrógeno por volatilización. Para esto, se estudiaron pastizales sometidos a cambios drásticos y continuados en su composición C_3/C_4 mediante el uso de herbicidas no selectivos que eliminan la vegetación perenne y facilitan la implantación de especies anuales invernales C_3 . La hipótesis es que el cambio del sistema C_3-C_4 original hacia uno con mayor proporción de especies C_3 , lleva a una menor relación C/N del material que ingresa al suelo, y esto aumenta el nitrógeno mineralizable y las pérdidas por volatilización de amoníaco. Se espera que estas respuestas se manifiesten de manera similar dentro de un gradiente climático y para distintos tipos de suelo. Aumentos en la proporción de especies C_3 se asociaron con disminuciones en la relación C/N de las fracciones más jóvenes de la materia orgánica del suelo. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el nitrógeno potencialmente mineralizable no estuvo asociado con la respuesta de la relación C/N, sino más bien con cambios—disminuciones en la cantidad de carbono en la materia orgánica particulada. Además, el aumento en la proporción de especies C_3 se asoció con aumentos en el $\delta^{15}N$ de la materia orgánica particulada, sugiriendo incrementos en las pérdidas por volatilización probablemente asociados a incrementos en la presión de pastoreo y digestibilidad del forraje. Estas respuestas mostraron la misma tendencia en pastizales con clima templado (vegetación mayormente C_3) y en pastizales subtropicales (vegetación mayormente C_4). En conclusión, el trabajo muestra que el cambio C_3/C_4 afectó el ciclado de nitrógeno de estos pastizales, y enfatiza el rol del animal en pastoreo como intermediario de dicho efecto.

Palabras clave: cambios C_3/C_4 , materia orgánica, C/N, N mineralizable, NH_3

ABSTRACT

C₃/C₄ SPECIES RATIO CHANGES IN NATURAL GRASSLANDS AND ITS EFFECTS ON POTENTIAL NITROGEN MINERALIATION AND $\delta^{15}\text{N}$ SIGNATURE

Nitrogen cycling is specially complex in grazed grasslands due to the diversity of species with contrasting growth periods, including N₂-fixing legumes, and to the consumption of forage by grazing animals with the consequent deposition of faeces and urine. This study analyses the relationship between changes in the C₃/C₄ ratio of the Río de la Plata grasslands and two aspects of nitrogen cycling: the potential for nitrogen mineralization and the content of ¹⁵N, an indicator of the importance of volatilization losses. For this, we studied grasslands subjected to drastic and continued changes in the C₃/C₄ composition by the use of herbicides that killed all perennial vegetation facilitating the establishment of annual C₃ winter grasses. The hypothesis is that changes towards a more C₃ vegetation will cause decreases in the C/N ratio of the material entering the soil, and that this will, in turn, increase the mineralizable nitrogen and losses from volatilization of ammonia. It is expected that these responses will be similar in a range of climates and soil types. Increases in the proportion of C₃ species were related to decreases in the C/N ratio of the particulate soil organic matter. However, opposite to expected, potential for nitrogen mineralization was not associated with the response in C/N ratio, but rather with changes –decreases– in the amount of carbon in particulate soil organic matter. Further, the increase in C₃ vegetation was associated with increases in $\delta^{15}\text{N}$, suggesting increases in volatilization losses probably associated with increased grazing pressure and forage digestibility. These responses were similar in grasslands under both temperate and subtropical climate. In conclusion, this study shows that changes in the C₃/C₄ ratio affected nitrogen cycling, and emphasize the role of the grazing animal as intermediary of that effect.

Key words: C₃/C₄ change, organic matter, C/N, mineralizable N, NH₃ losses.

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se estudió la relación entre la proporción de especies C_3 y C_4 y algunos aspectos del ciclado de nitrógeno (relación C/N de la materia orgánica, nitrógeno potencialmente mineralizable y pérdidas por volatilización de NH_3) en pastizales naturales del Río de la Plata. Estos pastizales se extienden a lo largo de un gradiente climático, abarcando desde ambientes subtropicales con dominancia de vegetación C_4 en el Litoral, hasta ambientes templados en la región Bonaerense, donde domina la vegetación C_3 . En esta región se localizan agro-ecosistemas de gran importancia económica y ecológica, ya que comprende entre 300,000 a 450,000 km^2 de pampas y campos en Argentina, Uruguay y Brasil, y alimenta a ~65 millones de rumiantes domésticos, mayormente en explotaciones extensivas dedicadas a la cría de ganado. La relación entre la proporción C_3/C_4 y el ciclado de nitrógeno no ha sido explícitamente estudiada en estos pastizales.

El ciclado de nitrógeno es especialmente complejo en pastizales pastoreados ya que, además de incluir diferentes especies vegetales con características y ciclos de producción contrastantes, presencia de leguminosas fijadoras de nitrógeno y ocasionales fertilizaciones con nitrógeno inorgánico, involucra la ingesta de forraje por parte de rumiantes y la consecuente deposición de heces y orina. Uno de los parámetros de gran importancia en el ciclo del nitrógeno es la relación carbono/nitrógeno (C/N) del material vegetal que se incorpora al suelo (hojas y raíces muertas, heces) y pasa a formar, gradualmente, la materia orgánica del suelo. Esto se debe a la notable influencia que ejerce sobre la velocidad y magnitud de su descomposición. Dos factores tienen una influencia decisiva en la relación C/N en estos pastizales. Uno es la disponibilidad de nitrógeno: mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo usualmente se asocia a un mayor tenor de nitrógeno de las plantas y por consiguiente una menor relación C/N tanto de material vivo como de la broza producida. El otro factor es la composición de especies, en particular la relación entre aquellas con síndrome fotosintético C_3 y las de síndrome fotosintético C_4 (proporción C_3/C_4 , a partir de aquí). La razón es que las plantas con fotosíntesis C_4 poseen un menor contenido intrínseco de nitrógeno que las especies C_3 , que les confieren una relación C/N mayor.

La importancia de cambios en la proporción de especies C_3/C_4 sobre diferentes aspectos del ciclo del nitrógeno y del carbono ha sido puesta de manifiesto en un estudio muy influyente realizado en pastizales templados de América del norte. En ese ecosistema, el aporte crónico de nitrógeno determinó una reducción drástica del

número y biomasa de especies C_4 y un incremento del nivel de nitrato en el suelo (Wedin; Tilman, 1996). Esto se asoció con una disminución de la relación C/N en broza y raíces, que los autores consideraron la causa principal de los aumentos observados en mineralización neta. Así, concluyen que “el agregado de nitrógeno es una grave amenaza para el ecosistema de pastizales” al afectar la diversidad funcional y provocar la disrupción de su funcionamiento.

En este trabajo se analiza la relación entre cambios en la proporción de especies C_3/C_4 y dos aspectos del ciclado de nitrógeno: la capacidad potencial de mineralizar nitrógeno y el contenido del isótopo ^{15}N , que es un indicador de la proporción del nitrógeno ciclado que se pierde del ecosistema por volatilización. Para esto, se estudian pastizales naturales que fueron sometidos a cambios drásticos y continuados en la proporción de especies C_3/C_4 mediante técnicas de promoción de especies invernales. Esta práctica de manejo sobre el pastizal natural consiste en la aplicación de un herbicida no selectivo a fines de verano para eliminar la vegetación verde y facilitar la implantación de especies con activo crecimiento otoño-invernal, especialmente raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.). La repetición de esta práctica provoca un reemplazo de la mezcla original de especies perennes C_3 y C_4 por una pastura anual mayormente C_3 .

El objetivo general de este trabajo fue, entonces, determinar si efectivamente cambios en la proporción de especies C_3/C_4 se traducen en cambios en la relación C/N de la materia orgánica del suelo, y si a su vez, esto lleva aparejado cambios en el nitrógeno potencialmente mineralizable del suelo y en la cantidad de ^{15}N . La hipótesis planteada es que el cambio del sistema C_3-C_4 original hacia uno con mayor proporción de especies C_3 , está asociado con aumentos de la calidad de la broza incorporada, que a su vez aumenta la velocidad de ciclado y las pérdidas de nitrógeno en el sistema. Por último, se espera que estas respuestas se manifiesten de manera similar dentro del gradiente climático y de tipos de suelo que abarca el pastizal natural del Río de la Plata.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Ciclo del nitrógeno en pastizales pastoreados

El ciclado de nitrógeno es especialmente complejo en pastizales pastoreados debido a que a la coexistencia de diferentes especies con características y ciclos de producción contrastantes, incluida la presencia de leguminosas fijadoras de nitrógeno, y ocasionales fertilizaciones con nitrógeno inorgánico, se suma la ingesta de forraje por parte de rumiantes y la consecuente deposición de heces y orina (Scholefield; Fischer, 2000).

La entrada de nitrógeno al suelo en los pastizales se produce principalmente a partir de los residuos orgánicos vegetales que se incorporan al suelo, de la fijación de N_2 atmosférico asociada a leguminosas o de la fertilización. Parte de los residuos orgánicos incorporados, al igual que la materia orgánica presente en el suelo, son mineralizados por acción de los microorganismos y el nitrógeno orgánico es convertido en formas orgánicas lábiles o inorgánicas (Swift et al., 1979). La mayor parte de este nitrógeno es absorbido nuevamente por plantas o por microorganismos del suelo que lo incorporan a sus tejidos o a compuestos orgánicos estables (Whitehead, 1995). La concentración de formas inorgánicas de nitrógeno -amonio y nitrato- en la solución del suelo es normalmente baja durante la descomposición de residuos vegetales. Esto limita las posibilidades de pérdidas por lavado, volatilización de amoníaco o desnitrificación (Jarvis et al., 1989). La presencia de animales en pastoreo cambia drásticamente esta situación.

2.1.1 Rol del animal en pastoreo:

El factor de mayor incidencia para el ciclado de nitrógeno en los sistemas pastoreados es el retorno a través de excretas de los animales. Los animales pueden llegar a consumir una importante proporción de la producción anual de biomasa vegetal aérea (Parsons et al., 1991), pero la proporción de nitrógeno consumido que es retenido por los animales en tejido corporal o producto es muy baja, menor al 10% en sistemas de producción de carne, y de hasta un 20% en sistemas de producción de leche (Scholefield; Fischer 2000). Estos índices de cosecha de nitrógeno son mucho menores que aquellos de sistemas agrícolas.

La mayor parte del nitrógeno que retorna desde el animal al suelo es excretada en heces y orina, y depositada en áreas localizadas del pastizal. Bajo pastoreo intensivo hasta un 40% del área es afectada al año por parches de orina, con una distribución relativamente uniforme (Lantinga et al., 1987). En condiciones mas

extensivas, tanto el área afectada como la uniformidad de la distribución se reducen notablemente, acrecentando la heterogeneidad y complejidad del sistema.

La cantidad de nitrógeno excretado depende en gran medida del contenido de nitrógeno de la dieta y de la cantidad de forraje consumido. Mientras que la excreción de nitrógeno en las heces por unidad de materia seca consumida permanece relativamente constante, el excretado en orina depende directamente del consumo de nitrógeno (Barrow, 1987). De esta manera, la proporción de nitrógeno que es excretado por orina puede pasar de valores muy bajos en forrajes de baja calidad hasta valores cercanos al 70% en forrajes con alto nitrógeno (Jarvis et al 1989).

Las excretas que retornan al sistema crean zonas de alta concentración de nitrógeno que, al exceder la demanda inmediata de plantas y microorganismos a su alrededor, crea un alto potencial de pérdidas por percolación o volatilización. Esto es especialmente válido para las excretas en orina: mientras que en heces la mayor parte del nitrógeno se encuentra formando parte de estructuras orgánicas (tejido vegetal indigestible, microorganismos, productos microbianos y endócrinos del animal (Mason, 1969)), del 70% al 90% del nitrógeno en orina está presente en forma de urea (Doak, 1952), el cual es rápidamente hidrolizado a amoníaco y volatilizado. La pérdida de amoníaco en parches de orina en pastizales extensivos puede alcanzar hasta el 30% del nitrógeno excretado, dependiendo de las condiciones climáticas (Frank et al., 2004).

2.2 Rol de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en el ciclado de nitrógeno

La "calidad" de la materia orgánica, definida como la facilidad con que puede ser degradada, influye sobre la mineralización de nitrógeno. La relación C/N es uno de los indicadores de calidad utilizado habitualmente como estimador de la cantidad de nitrógeno producido por unidad de materia orgánica degradada (Hart et al., 1994; Jarvis, 1996a; Mack; D'Antonio, 2003) y de su tasa de descomposición (Scherer; Lorenzen, 2008). Debido a esto, es considerado un componente importante de los modelos de descomposición (Palm; Rowland, 1997).

La importancia de la relación C/N en la descomposición de la broza se debe a que se considera que una relación C/N alta (>30, Wagner; Wolf, 1999) al limitar la disponibilidad de nitrógeno en relación a la demanda de los microorganismos, liberan nitrógeno inorgánico lentamente y pueden favorecer inmovilización, al menos en forma temporal (Hoobie, 1992). En el otro extremo, se sostiene que existe un umbral inferior en la relación C/N (<20, Wagner; Wolf, 1999) por debajo del cual la materia orgánica

se degrada rápidamente y disminuye drásticamente su rol como depósito del nitrógeno mineral inmovilizado por actividad de los microorganismos del suelo (Berendse, 1994). Este umbral estaría determinado por una oferta de nitrógeno en los tejidos vegetales mayor al requerimiento de los microorganismos y a su capacidad para utilizarlo (Wedin; Tilman, 1996).

Es importante destacar que ésta conexión entre la relación C/N de los residuos incorporados al suelo y la mineralización/inmovilización neta está basada en estudios realizados mayormente en sistemas agrícolas, donde la deposición y descomposición de materia orgánica ocurre en forma de pulsos, al final del ciclo del cultivo. En pastizales, la adición de residuos es un proceso continuo a lo largo de la estación de crecimiento (Dubeux et al., 2007).

Dos factores tienen una influencia decisiva en la relación C/N del material que se incorpora a la materia orgánica del suelo en pastizales: la disponibilidad de nitrógeno y la composición de especies. Una mayor disponibilidad de nitrógeno en el suelo usualmente se asocia a un mayor tenor de nitrógeno en hojas y raíces de las plantas (Gastal; Lemaire, 2002; Farruggia et al., 2004) y por consiguiente una menor relación C/N, tanto del material vivo como de los detritos incorporados. La composición de especies refiere, en el marco del presente trabajo, a la relación entre especies con síndrome fotosintético C_3 y las de síndrome fotosintético C_4 (en otros pastizales, la relación leguminosa/gramínea también es un determinante importante de la relación C/N). Las especies C_4 poseen un contenido de Rubisco 3 a 6 veces menor que en plantas C_3 (Sage et al., 1987). Esta característica, sumada a la particular anatomía (Kranz) de hojas C_4 , determina que su tejido tenga un menor contenido intrínseco de nitrógeno (Greenwood et al., 1990), lo que les confiere una relación C/N mayor.

Debido a la removilización que se produce durante la senescencia, el contenido de nitrógeno remanente en el material senescente representa generalmente entre 50 y 75% del presente en el material vivo (Whitehead et al., 1990) y por lo tanto la relación C/N de la broza tiende a ser mayor. Esta relación tiende a declinar en la medida que se produce el procesamiento de la materia orgánica en el suelo y la consecuente pérdida de carbono como CO_2 respirado por los microorganismos (Hirobe et al., 2003), hasta alcanzar valores cercanos a 10 u 11 en la materia orgánica más estable asociada con minerales (Oades y Waters, 1991).

La importancia otorgada a la relación C/N de la materia orgánica que se incorpora al suelo en estudios ecológicos se puede ilustrar a partir de un trabajo muy influyente realizado por Wedin y Tilman (1996) en pastizales templados de América

del norte. Estos autores observaron que incrementos crónicos del nivel de nitrógeno ingresado al sistema durante 12 años utilizando fertilizantes, estuvieron asociados con una reducción drástica de las especies C_4 y con una disminución de la relación C/N de la biomasa de broza y raíces. Esto último se adjudicó, principalmente, a diferencias en la composición de tejidos C_3 y C_4 , y en menor medida, a la mayor incorporación de nitrógeno por las plantas. Como resultado, se observó un aumento en la tasa de mineralización, un incremento en el contenido de nitratos en el suelo y consecuentemente, una menor capacidad de retención de nitrógeno. A causa de esto se concluyó que “el agregado de nitrógeno es una grave amenaza para el ecosistema de pastizales” al afectar la diversidad funcional y provocar la disrupción de su funcionamiento (Wedin; Tilman, 1996).

2.3 El manejo de promoción de especies invernales en pastizales del Río de la Plata

Los pastizales del Río del la Plata se extienden desde zonas con clima subtropical sin estación seca hasta zonas con clima templado-húmedo, caracterizados por precipitaciones distribuidas durante todo el año y temperaturas invernales moderadas. Este clima benigno permite el crecimiento de la vegetación a lo largo de casi todo el año, y por ende, el aporte de residuos vegetales y el pastoreo en forma continuada (Deregibus, 2000). Esto los diferencia de pastizales ubicados en otras regiones. Por ejemplo, la amplitud térmica entre invierno y verano es menor a la encontrada en pastizales con similar latitud y precipitación (e.g.: pastizales del norte de América), o a mayor latitud (e.g.: estepa asiática), o bajo climas con estación seca (e.g.: savanas)

Con respecto a la composición de especies, el gradiente climático determina variaciones en la proporción de especies C_3 y C_4 . En el norte dominan las especies C_4 , mientras que en el sur hay un mayor porcentaje de especies C_3 (Soriano, 1991). Por otro lado, la densidad de leguminosas y la actividad de los nódulos de *Rhizobium* –y por ende la fijación biológica de nitrógeno atmosférico- dependen en gran medida del contenido de fósforo en el suelo. La presencia de leguminosas en los pastizales naturales del Río de la Plata es variable, llegando a ser muy escasa en algunas zonas del noroeste donde este elemento es muy limitante (Deregibus, 2000).

La promoción de especies invernales es una práctica de manejo realizada sobre el pastizal natural con el objetivo de aumentar la producción invernal de forraje. Consiste en eliminar la vegetación natural perenne, tanto especies C_3 como C_4 , a

fines de verano mediante la aplicación de un herbicida sistémico no selectivo (usualmente glifosato), o disminuir su competencia mediante sobrepastoreo o corte mecánico (Arzadun et al., 2003). Con esto se facilita la implantación y desarrollo de gramíneas invernales (especies C_3), especialmente raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.), tanto mediante siembra directa como a partir del banco de semillas. En algunos casos se fertiliza con nitrógeno a fines de otoño para aumentar la producción de forraje, debido a deficiencia de formas asimilables de nitrógeno durante el invierno (Fernández Grecco; Mazzanti, 1996). Las dosis aplicadas son por lo general bajas (< 25 kg N ha⁻¹ año⁻¹). Usualmente, el tratamiento se repite todos los años, dando como resultado el reemplazo total de la vegetación natural perenne (Fernández et al., 2007, 2008).

2.4 $\delta^{13}C$ y biomasa C_3 y C_4

Se denomina isótopos estables a los átomos de un mismo elemento que tienen igual número de protones y un número diferente de neutrones, que no emiten radiaciones. Si bien para la mayoría de las finalidades las propiedades químicas de los isótopos estables pueden ser consideradas idénticas, existen pequeñas diferencias debidas a diminutas variaciones en el tamaño nuclear y a la masa suficientes para permitir su separación (West et al., 2006). En el caso de carbono, al isótopo liviano, que es el más abundante, se lo identifica como ^{12}C y al pesado como ^{13}C . La composición isotópica de un elemento se expresa en notación delta ($\delta^{13}C$) como el cociente $^{13}C/^{12}C$ en la muestra en relación al cociente $^{13}C/^{12}C$ en un mineral (PDB) utilizado como estándar de comparación.

Durante la asimilación de CO_2 en el proceso de fotosíntesis C_3 , existe discriminación en contra de ^{13}C , debido a que las moléculas de $^{12}CO_2$ difunden más rápido a través de los estomas y a que la enzima Rubisco muestra una marcada preferencia a favor de $^{12}CO_2$ (Farquhar et al., 1989). En el caso de fotosíntesis C_4 , la discriminación contra ^{13}C es más baja debido a que a diferencia de Rubisco, PEPC favorece la captura de $^{13}CO_2$. Debido a que las células de la vaina del haz vascular son poco permeables a CO_2 , esto minimiza la posibilidad de Rubisco de discriminar en contra de $^{13}CO_2$. La diferente magnitud de la discriminación entre especies C_3 y C_4 determina que el $\delta^{13}C$ del carbono fijado durante fotosíntesis sea menor en las primeras (Smith; Epstein, 1971). El $\delta^{13}C$ puede tener variaciones menores dentro de cada grupo de especies, dada principalmente por condiciones ambientales que

modifican la apertura estomática (Farquhar et al., 1989) y discriminación durante procesos post-fotosintéticos (Galimov, 1985).

La diferente composición isotópica de especies C_3 y C_4 provee una manera simple de cuantificar la contribución de carbono- C_3 y carbono- C_4 en la formación de materia orgánica del suelo, ya que las diferencias en $\delta^{13}C$ se conservan durante transformaciones de carbono (Marin et al., 1990). Esto permite hacer inferencias sobre la proporción de especies C_3/C_4 en la biomasa que le dio origen. En este sentido, diversos estudios han utilizado el $\delta^{13}C$ de la materia orgánica del suelo para establecer en qué medida ésta fue sintetizada a partir de biomasa C_3 o C_4 , por ejemplo en rotaciones que incluyan cultivos C_3 y C_4 (Balesdent; Balabane, 1996). Como la entrada de carbono al suelo es mayor en los horizontes superficiales, el análisis del patrón de $\delta^{13}C$ en el perfil del suelo ha permitido inferir la ocurrencia de cambios en la vegetación, por ejemplo de dominancia de árboles (C_3) a dominancia de pastizales C_4 (Boutton, 1996).

2.5 Nitrógeno Potencialmente Mineralizable

El nitrógeno potencialmente mineralizable es un indicador de la capacidad de la materia orgánica del suelo de proveer a la solución del suelo con nitrógeno en una forma lábil, fácilmente accesible para plantas y microorganismos, pero también susceptible de perderse del sistema. La producción de amonio en incubación anaeróbica de corto plazo, desarrollada por Waring y Bremner, (1966), es una técnica recomendada como un indicador de esta característica (Keeney, 1982). Una de las ventajas de este método es que sólo un pequeño porcentaje del nitrógeno mineralizado en estas condiciones es inmovilizado por los microorganismos anaeróbicos implicados en el proceso (Wang et al., 2001). Además, correlaciona bien con mineralización bruta (Accoe et al., 2004). Tiene, además, ventajas operativas respecto a otros indicadores al no requerir instrumental ni reactivos complejos, la incubación es corta y no requiere controles, y escasa o nula influencia del pretratamiento de la muestra sobre los resultados (Keeney, 1982).

El nitrógeno potencialmente mineralizable anaeróbico es recomendado por la bibliografía internacional como un sensible indicador de la calidad y fertilidad del suelo (Doran; Jones, 1996; Doran; Parkin, 1994; Larson; Piersen, 1994; Bending et al., 2004; Marinari et al., 2006). Así, ha sido utilizado para diversos estudios, incluyendo el monitoreo del efecto de prácticas de manejo a gran escala abarcando una amplia diversidad de tipos de suelo y actividades agropecuarias de largo plazo (Schipper;

Sparling, 2000), el efecto de rotaciones de cultivos en el corto plazo (Benintende et al., 2008), y el efecto de distintos métodos de labranza (Fabrizzi et al., 2003).

Para suelos de pastizales naturales del Río de la plata, tanto de la región pampeana (Echeverría et al., 2000) como para la región litoral (Benintende et al., 2004), se demostró que el amonio producido durante incubaciones anaeróbicas correlaciona bien con la cantidad de nitrógeno potencialmente mineralizable estimado mediante incubación aeróbica de largo plazo. Videla et al. (2005) también encontraron una significativa correlación con la tasa de mineralización bruta de nitrógeno para suelos bajo labranza en la región bonaerense.

2.6 $\delta^{15}\text{N}$ como indicador de pérdidas de nitrógeno

La abundancia isotópica de nitrógeno se expresa en notación delta ($\delta^{15}\text{N}$) como el cociente entre la abundancia del isótopo pesado (^{15}N) y el isótopo liviano (^{14}N) en la muestra ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), en relación al cociente $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en N_2 atmosférico, utilizado como estándar de comparación.

El $\delta^{15}\text{N}$ de la vegetación y el suelo es producto de la magnitud y composición isotópica de las entradas y salidas, y las transformaciones internas que ocurren en el sistema suelo-planta (Nadelhoffer; Fry, 1994, Mariotti et al., 1982). Todo proceso que permita la discriminación isotópica y posterior pérdida del producto isotópicamente liviano o la presencia de un factor disminuyendo el flujo de nitrógeno que ingresa y es almacenado como materia orgánica, empuja a que el sistema se enriquezca en ^{15}N (Frank et al., 2004).

El fraccionamiento isotópico de 30–60‰ que ocurre durante la volatilización de amoníaco, es un mecanismo por el cual se incrementa el $\delta^{15}\text{N}$ en sistemas pastoreados (Högberg, 1997; Robinson, 2001). Otras posibles vías de pérdidas de nitrógeno son desnitrificación y el lavado de NO_3 en profundidad. Estas vías también podrían inducir incrementos en $\delta^{15}\text{N}$ del nitrógeno remanente, pero este enriquecimiento es menos pronunciado y altamente variable (Ostrom et al., 1998). Por lo tanto, aumentos en $\delta^{15}\text{N}$ pueden ser asociadas casi exclusivamente con aumentos en pérdidas de nitrógeno por volatilización, generalmente correlacionado con aumentos de carga animal por la mayor cantidad de excretas producidas por área (Schwertl et al., 2005).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar si incrementos en la proporción de especies C_3 y la fertilización con nitrógeno, conducen a incrementos en la calidad de la materia orgánica del suelo y como consecuencia, en la cantidad de nitrógeno potencialmente mineralizable y el riesgo de pérdidas por volatilización, bajo distintos ambientes climáticos y un amplio rango de suelos en pastizales naturales del Río de la Plata. Los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar el efecto del incremento de la proporción de especies C_3 sobre la relación C/N de fracciones de materia orgánica del suelo de distinta labilidad.
2. Analizar la influencia del agregado de nitrógeno sobre la magnitud de estos cambios en la relación C/N.
3. Examinar la asociación entre cambios en la relación C/N en las fracciones de la materia orgánica del suelo y el nitrógeno potencialmente mineralizable del suelo total.
4. Evaluar cambios en el contenido del isótopo ^{15}N (un indicador de pérdidas por volatilización) y su asociación con la relación C/N, en las distintas fracciones de la materia orgánica del suelo.
5. Verificar las relaciones entre cambio de especies - relación C/N – mineralización potencial de nitrógeno – $\delta^{15}\text{N}$, para dos ambientes climáticos (templado y subtropical) y para distintos suelos

3.2 Hipótesis

1. El aumento de la proporción de especies C_3 en un pastizal mixto C_3 - C_4 reduce la relación C/N de las fracciones más jóvenes de materia orgánica del suelo.
2. La reducción en la relación C/N producto del cambio de especies se acentúa cuando se fertiliza con nitrógeno.
3. Una menor relación C/N de la materia orgánica está asociada a una mayor capacidad de mineralizar nitrógeno.
4. La disminución de la relación C/N de la materia orgánica que ingresa al suelo, y por lo tanto del forraje consumido por los animales en pastoreo, aumenta la proporción de nitrógeno que se pierde por volatilización.
5. La concordancia mayor proporción de especies C_3 – menor relación C/N – mayor nitrógeno potencialmente mineralizable – mayor volatilización, se mantiene para un amplio rango de condiciones climáticas y tipos de suelo.

4. MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se detalla la realización de muestreos de suelo en diversos pastizales naturales ubicados a lo largo de un gradiente climático que abarca desde ambientes subtropicales, donde domina vegetación mayormente C₄, hasta ambientes templados, donde dominan las especies C₃. Específicamente, se definen y explican los criterios utilizados en la selección de sitios y de las situaciones de manejo allí muestreadas, así como los protocolos de recolección de muestras y su posterior acondicionamiento.

A continuación, se detalla el procedimiento de separación de la materia orgánica en fracciones de diferente tamaño, realizado con el fin de detectar cambios de corto plazo en las fracciones de materia orgánica de mayor tamaño que son de más reciente incorporación. Luego, se listan y explican las determinaciones realizadas sobre dichas muestras que permitieron caracterizar los sitios (pH, textura, densidad aparente), estimar la relación C/N (%C, %N), la proporción de material de origen C₃ y C₄ ($\delta^{13}\text{C}$), el potencial de mineralización de nitrógeno y un índice de pérdida de nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$). Finalmente, se demuestra que el suelo y la vegetación original de las diferentes situaciones de manejo muestreadas en cada sitio eran similares.

4.1 Situaciones de manejo muestreadas

En este trabajo no se realizaron experimentos controlados, sino que se realizaron muestreos apareados comparando situaciones pre-existentes de manejo del pastizal natural con controles aledaños, ubicados en diferentes establecimientos comerciales o campos experimentales de organismos de investigación (llamados "sitios"), en la región Bonaerense y en el Litoral. Las categorías identificadas y sus características fueron:

4.1.1 Pastizal natural (control)

Pastizal natural con una composición de especies propia del cada sitio muestreado, que representaba fielmente la situación inicial antes de iniciada la promoción de especies invernales.

4.1.2 Promoción de gramíneas invernales (C₃) basada en la aplicación de herbicidas

La promoción de especies invernales es una práctica de manejo realizada sobre el pastizal natural con el objetivo de aumentar la producción invernal de forraje. Consiste en eliminar la vegetación natural perenne, tanto especies C₃ como C₄, a

fines de verano mediante la aplicación de un herbicida sistémico no selectivo (glifosato, a veces con adiciones de 2,4 D para mejorar la eliminación de especies dicotiledóneas). Con esto se facilita la implantación y desarrollo de gramíneas invernales (especies C_3), especialmente raigrás anual (*Lolium multiflorum* L.), tanto mediante siembra directa como a partir del banco de semillas. Usualmente, el tratamiento se repite todos los años, dando como resultado el reemplazo total de la vegetación natural perenne por una pastura anual de producción otoño-invierno-primaveral.

4.1.3 Promoción de gramíneas invernales (C_3) y fertilización con nitrógeno

Esta práctica es similar a la anterior, solo que adicionalmente se fertiliza con nitrógeno a fines de otoño para aumentar la producción de forraje. Las dosis aplicadas son por lo general bajas ($< 25 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$). Este tratamiento se repite esporádicamente, dependiendo de condiciones climáticas y financieras de los productores.

4.1.4 Promoción de leguminosas, sin aplicación de herbicidas

Esta práctica de manejo se realiza con el mismo objetivo que las anteriores, pero provoca un efecto menos drástico sobre las especies perennes. Consiste en sobrepastorear el pastizal natural a fines de verano para disminuir la competencia, implantar *Lotus* sp. mediante siembra directa y fertilizar con fósforo para promover el desarrollo de la leguminosa. También se logra el establecimiento espontáneo de algunas gramíneas anuales C_3 , pero en baja proporción. Este tratamiento usualmente se realiza una única vez.

4.2 Área de estudio: criterios de selección de situaciones y sitios de muestreo

Se identificaron 24 sitios a lo largo de una transecta de aproximadamente 1000 km, abarcando pastizales naturales desde el Litoral ($29,3^\circ \text{ S}$) al sudeste Bonaerense ($37,1^\circ \text{ S}$). La distribución de los sitios en este gradiente climático estuvo restringida por el limitado uso de la práctica de promoción en el norte del Litoral y por el reemplazo de pastizales por agricultura en el norte de la región Bonaerense. En cada sitio de muestreo se identificó un lote con pastizal natural y uno o dos lotes con promoción que cumplieran con los siguientes criterios de selección:

- Suelo y topografía: lotes con similar tipo de suelo y ubicación en el paisaje. En zonas de topografía ondulada, muestreos en la media loma, evitando bajos inundables.

- Uso actual y precedente: uso pastoril exclusivo, sin antecedentes de agricultura o pasturas implantadas

- Antigüedad y permanencia: promociones con un manejo que haya asegurado una presencia continua de especies C_3 durante al menos 3 años.

- Presencia de leñosas: zonas dentro del lote sin árboles o arbustos. En caso de pastizales en zonas originalmente cubiertas por monte, se seleccionaron lugares con presencia de pastizal natural control y promoción con el mismo tratamiento de desmonte

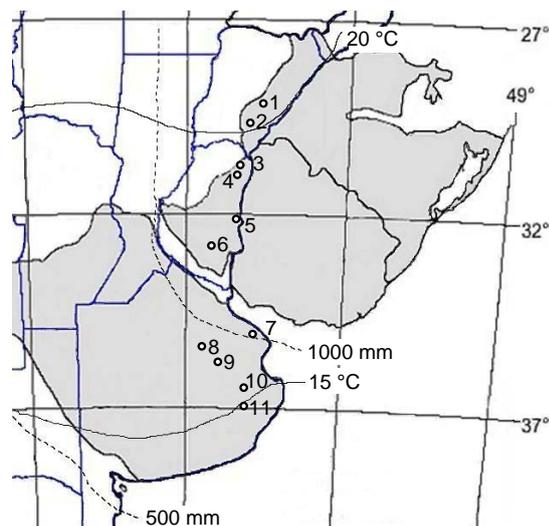


Figura 1: Distribución de los 11 sitios de muestreo utilizados para realizar comparaciones entre promoción y su respectivo control apareado. En el sitio 10 se muestrearon dos promociones comparadas con un control común. En color gris se muestra la extensión original del pastizal natural del Río de la Plata (Soriano, 1991), con líneas punteadas las isohietas de 500 y 1000 mm, y con líneas continuas las isotermas de 15 y 20 °C.

Luego de un riguroso proceso de selección basado en análisis de suelo posteriores (ver apartado 1.7), finalmente se consideró que sólo 11 de esos sitios cumplían los requisitos establecidos para comparar los valores de nitrógeno potencialmente mineralizable, relación C/N de la materia orgánica, concentración y

composición isotópica de C y N, entre promoción y control. La distribución de estos 11 sitios se muestra en la Figura 1. Sin embargo, los 24 sitios fueron utilizados para

Cuadro 1: Características edáficas y climáticas de los 11 sitios muestreados, ordenados por región y latitud.

Región/Provincia	Sitio	Latitud °L Sur	¹ Precip. mm año ⁻¹	¹ Temp. °C	Precip/temp mm año ⁻¹ °C ⁻¹	Textura %			Suelo Orden/ Sub-Orden	pH	MO	N %	² C-C ₃
						Arena	Limo	Arcilla					
Litoral													
Corrientes	1	29,3	1246	20,1	61,9	48	38	14	Molisol, Acuol	6,1	4,1	0,19	18
	2	29,6	1232	19,9	61,8	21	55	24	Molisol, Udol	5,4	8,7	0,45	7
Entre Ríos	3	30,3	1201	19,4	61,8	s/d	s/d	s/d	Molisol, Acuol	5,5	7,5	0,37	32
	4	30,7	1183	19,2	61,7	42	26	32	Molisol, Acuol	5,7	8,3	0,39	33
	5	32,5	1099	17,9	61,5	62	24	14	Molisol, Udol	5,6	4,9	0,25	45
	6	33,1	1074	17,5	61,5	4	58	39	Molisol, Udol	6,4	9,1	0,51	59
Bonaerense													
Buenos Aires	7	35,3	974	15,9	61,2	14	69	18	Molisol, Udol	6,1	5,9	0,31	87
	8	35,9	944	15,4	61,1	45	43	12	Molisol, Udol	6,6	9,5	0,51	70
	9	36,3	928	15,2	61,0	42	51	7	Molisol, Udol	6,3	5,3	0,30	65
	10	36,7	907	14,9	61,0	29	52	19	Molisol, Acuol	6,3	8,8	0,44	53
	11	37,1	890	14,6	60,9	22	57	21	Molisol, Acuol	6,3	12,4	0,69	72

(1) Estimado por extrapolación de registros cercanos. (2) Proporción de carbono de origen C₃. (s/d) sin dato.

Cuadro 2: Principales características de las promociones muestreadas.

Región/Provincia	Sitio	Latitud	Tipo de promoción	Fertilización	Duración	Incremento especies C ₃ (visual)	Detalles
		°L Sur		kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	años		
Litoral							
Corrientes	1	29,3	Raigrás, con herbicida	0	3	Bajo	interrumpida
	2	29,6	Raigrás, con herbicida	30	4	Alto	
Entre Ríos	3	30,3	Lotus, a diente	0	4	Bajo	Desmontado
	4	30,7	Raigrás, con herbicida	22	6	Alto	Desmontado
	5	32,5	Raigrás, con herbicida	40	11	Alto	Desmontado
	6	33,1	Raigrás, con herbicida	30	5	Bajo	Desmontado
Bonaerense							
Buenos Aires	7	35,3	Raigrás, con herbicida	46	7	Alto	Desmontado
	8	35,9	Raigrás, con herbicida	0	7	Alto	
	9	36,3	Raigrás, con herbicida	0	9	Alto	
	10a*	36,7	Raigrás, con herbicida	15	7	Alto	
	10b*	36,7	Raigrás, con herbicida	15	10	Alto	
	11	37,1	Raigrás, con herbicida	25	7	Alto	

(*) Ambas promociones se encuentran en el mismo sitio y fueron comparadas respecto al mismo control.

analizar correlaciones entre los valores absolutos de nitrógeno potencialmente mineralizable y el contenido de carbono y nitrógeno en las distintas fracciones en que se separó la materia orgánica.

El Cuadro 1 resume las características de los sitios muestreados, mientras que el Cuadro 2 resume las características de las promociones muestreadas.

4.3 Recolección y acondicionamiento de las muestras de suelo

Los muestreos se realizaron durante el invierno y la primavera de 2007. En cada lote, se delimitó un área de aspecto homogéneo de aproximadamente 1 ha en la cual se extrajo con un muestreador de acero inoxidable (\varnothing 2,5 cm), una muestra compuesta por un mínimo de 20 submuestras (*i.e.* puntos de muestreo), de los 5 cm superficiales de suelo (incluyendo broza superficial). Las muestras fueron secadas al aire durante 10 a 30 días, y finalmente secadas en estufa a 30 °C durante tres días. Luego, se disgregaron manualmente (presionando con un martillo de madera en algunos casos) homogenizaron y tamizaron por 2 mm. Finalmente fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento y análisis.

4.4 Fraccionamiento de la materia orgánica del suelo

Las muestras de suelo fueron fraccionadas físicamente por tamaño y densidad de partículas. Este procedimiento se realizó para poder detectar cambios de corto plazo a partir del análisis de las fracciones de materia orgánica de mayor tamaño, de reciente incorporación. La relación existente entre tamaño de la fracción y su edad se debe a que a medida que los tejidos vegetales son descompuestos e incorporados en la materia orgánica, se reduce progresivamente su tamaño y la velocidad de su degradación, debido a que forma complejos físico-químicos con partículas de limo y arcilla que la protegen de los microorganismos del suelo (Oades, 1993).

Se siguió el método desarrollado por Gavinelli et al. (1995) con las adaptaciones realizadas por Videla y Trivelin (2008): se colocaron 30 gramos de suelo con 100 mL de hexametáfosfato de sodio 0,5%, con 3 perlas de vidrio de 10 mm de diámetro en recipientes plásticos. La suspensión suelo-solución fue homogeneizada manualmente durante 10 a 15 segundos y luego se colocó en heladera a 4°C durante 16 horas para favorecer la ruptura de agregados por contracción. Luego se pusieron en un agitador orbital regulado a 100 giros por minuto durante 2 horas. Posteriormente, la suspensión de suelo se separó por tamaño, utilizando en forma progresiva tamices de 200 μ m y

53 μm . El material retenido en los tamices se lavó con agua desionizada mediante un pulverizador de gota fina. El material mayor a 200 μm fue separado en liviano y pesado por flotación en agua. Quedaron así definidas las siguientes fracciones de suelo:

Fracción particulada gruesa liviana: fracción de suelo retenida en el tamiz de 200 μm y separada por flotación en agua, constituida fundamentalmente por restos de raíces y plantas. A la materia orgánica contenida en esta fracción se la denomina “**MOP₂₀₀₋₂₀₀₀**”.

Fracción particulada gruesa pesada: fracción de suelo retenida en el tamiz de 200 μm y que sedimentó al suspenderse en agua, constituida fundamentalmente por partículas gruesas de arena. La cantidad de materia orgánica contenida en esta fracción es virtualmente cero.

Fracción particulada fina: fracción de suelo retenida en el tamiz de 53 μm de naturaleza organo-mineral. A la materia orgánica contenida en esta fracción se la denomina “**MOP₅₃₋₂₀₀**”.

Fracción asociada a minerales: fracción de suelo que pasó por el tamiz de 53 μm , también de naturaleza organo-mineral, que incluye partículas minerales de tamaño limo y arcilla, microagregados organo-minerales con distinto grado de estabilidad y materia orgánica amorfa, humificada y fuertemente ligada a las partículas minerales. A la materia orgánica contenida en esta fracción se la denomina “**MOAM**”.

Estas cuatro fracciones se secaron en estufa con circulación de aire a 60 °C hasta peso constante. La proporción relativa de cada fracción respecto al suelo total (% fracción) se obtuvo dividiendo su peso seco ($g_{\text{fracción}}$), por la suma del peso de todas las fracciones de una misma muestra.

Las fracciones particulada gruesa liviana, gruesa pesada y asociada a minerales se molieron finamente en un molino de bolas (MM 2000, Retsch, Alemania), y fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 2,2 ml hasta su posterior análisis.

En la figura 2 se resume en forma esquemática este fraccionamiento y otros tratamientos realizados en las muestras de suelo para la obtención de las principales variables analizadas.

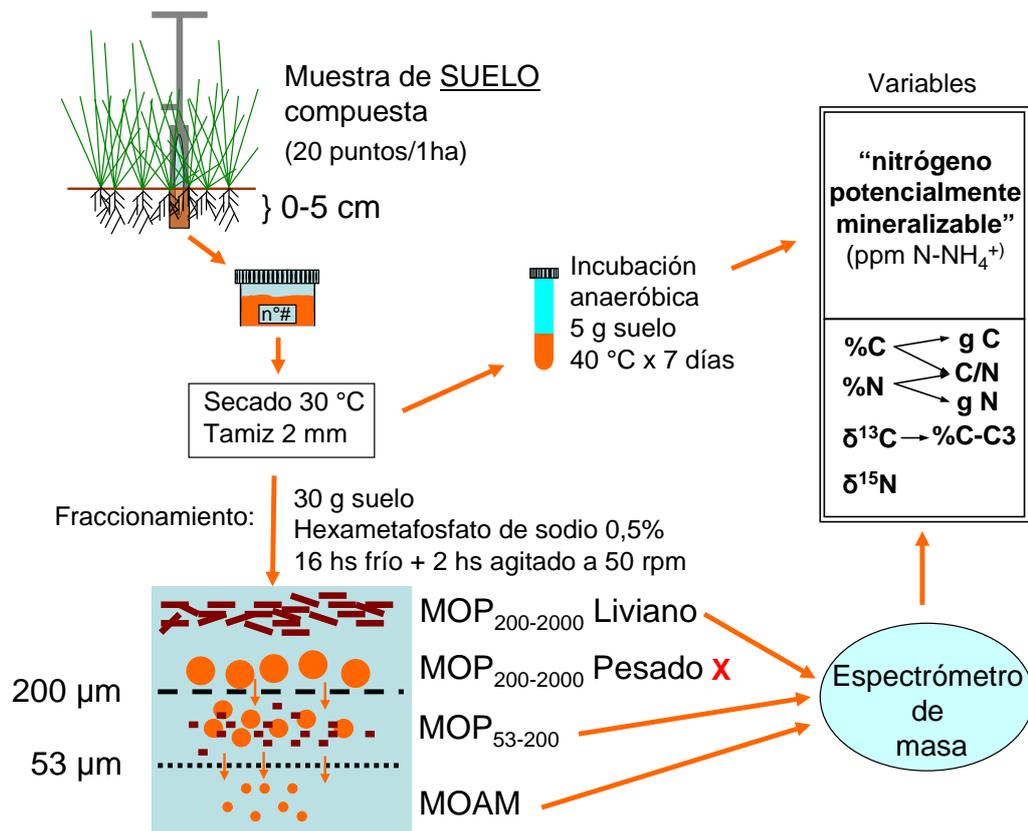


Figura 2: esquema muestreo y tratamiento en las muestras de suelo para la obtención de las principales variables analizadas.

4.5 Variables analizadas en las muestras de suelo

4.5.1 Textura

Se realizaron análisis de textura de los suelos de pastizal natural (control) con el método de la pipeta de Robinson (Gee; Bauder, 1986) en el laboratorio de Análisis de Suelos de la EEA Balcarce.

4.5.2 pH

Se determinó la acidez actual, pH, en una suspensión 1:2,5 mezclando 10 g de suelo en 25 mL de agua desionizada a 25 °C y agitando con una varilla de vidrio durante aproximadamente 10 segundos. La suspensión se dejó reposar durante una hora manteniendo la temperatura constante y se realizó la lectura de la concentración de H⁺ mediante un potenciómetro.

4.5.3 Contenido y composición isotópica de carbono y nitrógeno

La concentración (%C y %N por unidad de suelo seco) y la composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) fueron obtenidos a partir de análisis de pequeñas alícuotas de suelo de las fracciones MOP₂₀₀₋₂₀₀₀, MOP₅₃₋₂₀₀ y MOAM. Para esto, se pesaron entre 2 mg y 10 mg de suelo seco (dependiendo de la concentración de carbono de la fracción analizada) en cápsulas de aluminio (4 x 6 mm). Este material fue gasificado por combustión en un analizador elemental (NA 1108, Carlo Erba, Milan, Italia). Luego, el CO₂ y N₂ producidos fueron separados por cromatografía de gases (Conflo III, Finnigan MAT, Bremen, Alemania) y analizados en un espectrómetro de masas de isótopos (Delta Plus, Finnigan MAT, Bremen, Alemania). La concentración y composición isotópica de carbono y nitrógeno del suelo total fueron calculadas ponderando los datos de cada fracción por su peso (en base carbono o nitrógeno) respecto al suelo total. La proporción del total de carbono o nitrógeno del suelo ubicada en cada fracción, expresada como mg carbono ó mg nitrógeno por kg de suelo, se calculó como:

$$\text{mg C o mg N kg}^{-1} \text{ suelo}^{-1} = \text{Peso fracción (g)} * \% \text{C o \%N} * 10000 * 30^{-1} \text{ g}^{-1}$$

Se consideró que la suma del contenido de carbono o nitrógeno de todas las fracciones para una misma muestra, es igual al contenido de estos elementos en la materia orgánica total del suelo.

La proporción de carbono de origen C₃ (%C-C₃) para cada una de las fracciones se estimó a partir de la composición isotópica del carbono ($\delta^{13}\text{C}$), mediante la ecuación:

$$\% \text{C-C}_3 = [(\delta^{13}\text{C}_{\text{mstra}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}) / \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3-\text{C}_4}] * 100$$

Donde, $\delta^{13}\text{C}_{\text{mstra}}$ es la composición isotópica de la fracción analizada, $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}$ es la composición isotópica de un suelo bajo una vegetación exclusivamente C₄, y $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3-\text{C}_4}$ es la diferencia isotópica existente entre especies C₃ y C₄. El parámetro $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}$ (=14‰) y $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3-\text{C}_4}$ (=14‰) fue estimado a partir de datos propios para especies C₃ y C₄ presentes en el pastizal (datos no publicados).

4.5.4 Nitrógeno Potencialmente Mineralizable

El nitrógeno potencialmente mineralizable se estimó para el suelo total mediante la metodología de incubación anaeróbica de Waring y Bremner (1964). La producción de amonio durante incubación anaeróbica es un índice recomendado (Keeney, 1982)

y ampliamente utilizado (Schipper and Sparling, 2000; Wang et al., 2001 Benintende 2008) como indicador de nitrógeno potencialmente mineralizable.

Se colocaron por duplicado 5 g de suelo de cada muestra en un tubo de ensayo (150 mm de largo por 16 mm de diámetro) y se agregó aproximadamente 20 mL de agua desionizada hasta completar el volumen. Se cerraron herméticamente y se incubaron en estufa a 40 °C durante 7 días. Finalizada la incubación, la mezcla suelo-agua se trasvasó a un balón de destilación con 20 mL de KCl 2M y 0,5 g de MgO calcinado. El N-NH₄⁺ liberado por destilación se recogió en un Erlenmeyer con H₃BO₃ 2% y se tituló con H₂SO₄ 0,005 N. Previo al inicio de la destilación se realizó un blanco para descontar la presencia de nitrógeno de un origen distinto al del suelo.

Los mg de N-NH₄⁺ por kg de suelo presentes en la muestra incubada se calcularon a partir del volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación, según la ecuación:

$$\text{N-NH}_4^+ (\text{mg Kg}^{-1}) = (\text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ muestra} - \text{mL H}_2\text{SO}_4 \text{ blanco}) \text{ N} * \text{P}_{\text{meqN}} * \text{k} * \text{P}_{\text{mstra}}^{-1}$$

Donde:

N: normalidad del H₂SO₄ = 0,005 meq mL⁻¹

P_{meqN}: peso miliequivalente del nitrógeno = 0,014 g meq⁻¹

k: constante de conversión de unidades = 1000000 mg kg⁻¹

P_{mstra}: peso de la muestra de suelo = 5 g

La producción de N-NH₄⁺ durante la incubación se calculó restando el N-NH₄⁺ presente en la muestra sin incubar, utilizando el mismo procedimiento. Este valor fue el utilizado como indicador del Nitrógeno Potencialmente Mineralizable.

4.6 Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos promoción y control, tanto en valores absolutos como en porcentajes relativos, se analizaron mediante pruebas *t* para muestras apareadas por sitio. Las diferencias entre regiones se analizaron comparando las medias con una prueba *t* para muestras independientes. Correlaciones entre variables fueron analizadas mediante el test de correlación de Pearson, y mediante análisis de regresión lineal y no lineal con los paquetes SAS y TBLCurve.

4.7 Interferencias por prácticas de manejo desconocidas, condiciones iniciales de sitios promocionados y efectos secundarios de la promoción

Dada la naturaleza no controlada de la mayoría de los sitios muestreados, fue necesario descartar lotes con disturbios generados por alguna práctica de manejo no deseada (desconocida por la fuente consultada) o contaminaciones accidentales de la muestra, que interfirieran sobre las variables analizadas. Adicionalmente se comprobó que en cada sitio, la vegetación original y la textura del lote con promoción se correspondan con las del lote elegido como pastizal natural control.

La semejanza en la vegetación inicial de los lotes promocionados y sus respectivos controles se chequeó mediante la composición isotópica del carbono y nitrógeno de la materia orgánica de la fracción asociada a minerales. Esta fracción tiene muy baja tasa de recambio, por lo cual debería estar poco afectada por la relativamente corta duración de las promociones. Por ende, similar marcación isotópica del carbono y nitrógeno entre la promoción y el pastizal natural control fue considerada como indicadora de similar origen. Se adoptó el criterio de descartar los sitios con más de 2‰ de diferencia en $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{15}\text{N}$ en la MOAM. Este procedimiento es sin dudas estricto, ya que descarta sitios que tuvieron idénticas condiciones iniciales pero en los que la promoción modificó la materia orgánica asociada a minerales. Sin embargo, la falta de otra información confiable determinó que se adoptase este criterio.

La variable utilizada para chequear la semejanza en la textura fue la proporción arena, estimada a partir de la fracción particulada gruesa pesada y la particulada fina en relación al suelo total. Este componente es invariable e intrínseco de la textura de cada suelo y por lo tanto no debería ser afectado por el manejo de promoción (Figura 4).

Además, se chequeó que en el pastizal natural control la composición isotópica del carbono de las 3 fracciones en que se separó la materia orgánica tuviera un valor similar entre sí. Esto indicaría que la vegetación se mantuvo relativamente constante en el tiempo. Simultáneamente se comprobó que, en la promoción, la composición isotópica del carbono de la materia orgánica particulada gruesa y fina fueran iguales o menores al valor de las mismas fracciones para el pastizal natural control.

Solo 11 de los 24 sitios muestreados fueron utilizados para analizar diferencias entre lotes promocionados y lotes con pastizal natural control (Figura 3). Sin embargo, los valores absolutos de todos los sitios fueron utilizados para medir la asociación

entre nitrógeno potencialmente mineralizable y el contenido de carbono o nitrógeno en las fracciones de materia orgánica.

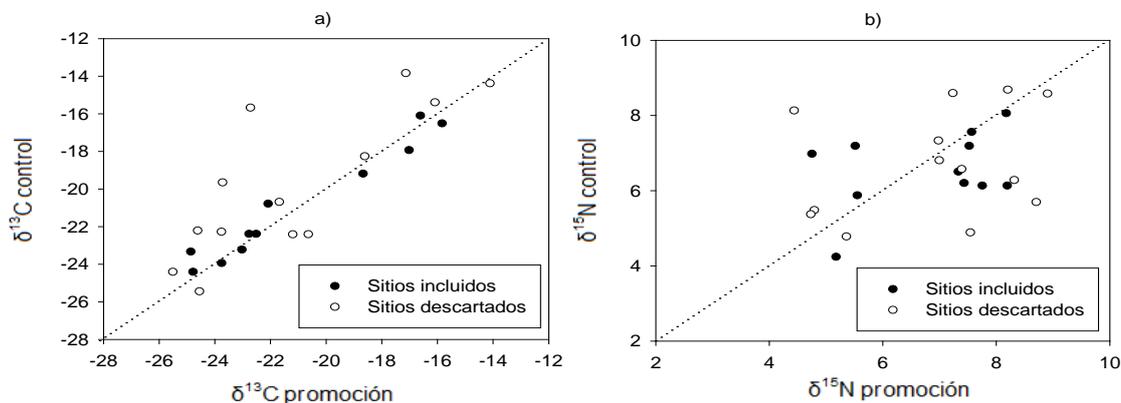


Figura 3: a) $\delta^{13}\text{C}$ y b) $\delta^{15}\text{N}$ en materia orgánica asociada a minerales de 0-5 cm de profundidad, en promoción y en pastizal natural control. La línea de puntos indica la relación 1:1.

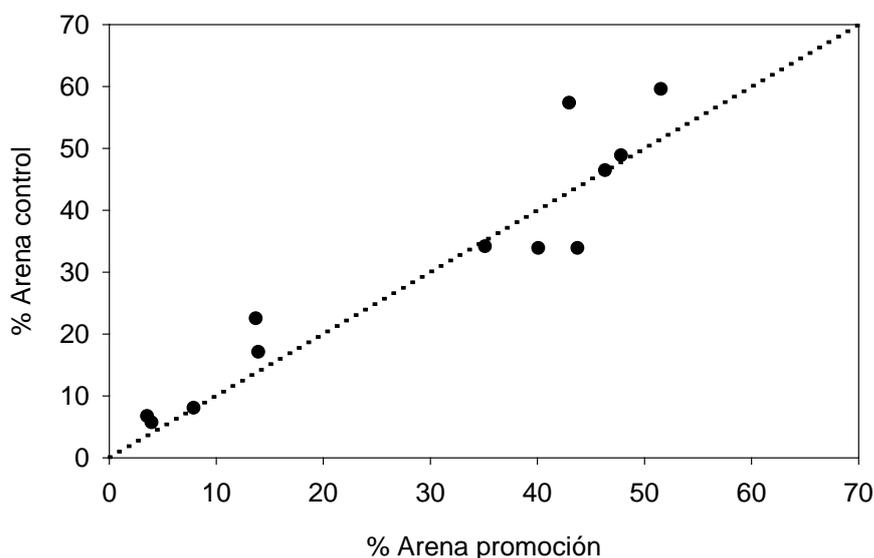


Figura 4: Porcentaje de arena de 0 a 5 cm de profundidad en promoción y pastizal natural control. Corresponde a la suma del peso de las fracciones $\text{MOP}_{200-2000}$ pesada y MOP_{53-200} , dividido por el peso total del suelo fraccionado ($\text{g g}^{-1} 100$). Cada punto representa una promoción-control apareada. La línea punteada indica la relación 1:1.

Además de asegurar la similitud en condiciones iniciales entre lotes promocionados y pastizales naturales control, hubo que descartar la existencia de efectos secundarios derivados de la práctica de promoción no ligados al cambio de especies ya que podría llevar a inferencias erróneas. Uno de los efectos posibles

secundarios testeados fue si la acidez del suelo se incrementó con el agregado de fertilizantes nitrogenados basados en urea. Los resultados muestran claramente que la promoción no produjo modificaciones importantes en el pH respecto a los pastizales naturales control. El promedio en ambos casos fue de 5,8 en la región litoral y 6,3 en la bonaerense. El desvío promedio de la diferencia entre promoción y control fue de 0,2 unidades, tanto positivas como negativas, alcanzando el valor de 0,75 en solo un caso (datos no mostrados).

Otro de los efectos evaluados fue la ocurrencia de compactación. Si hubieran ocurrido cambios en densidad aparente luego de la promoción, conducirían a diferencias espurias en las variaciones en el contenido y composición isotópica de carbono y de nitrógeno en los primeros centímetros de suelo (*i.e.* producto de la cantidad de suelo en los 5 cm superficiales muestreados y no del tratamiento de manejo del pastizal). Por esto, se estimó la densidad aparente de los estratos 0–5 cm y 5–10 cm en la promoción y en el pastizal natural control. Para esto se utilizó el método del cilindro volumétrico (Blake; Hartge, 1986): se extrajeron 6 a 8 muestras de suelo mediante cilindros metálicos de 5 cm de diámetro y 5 cm de altura, previa eliminación de vegetación y broza. Las muestras se secaron en estufa a 105 °C durante 48 horas y luego se pesaron. Finalmente, la densidad aparente se calculó como el peso de suelo seco dividido por el volumen ocupado (g cm^{-3}). La densidad aparente de los primeros 5 cm de suelo de las promociones tampoco se modificó, respecto al pastizal natural control (Figura 5).

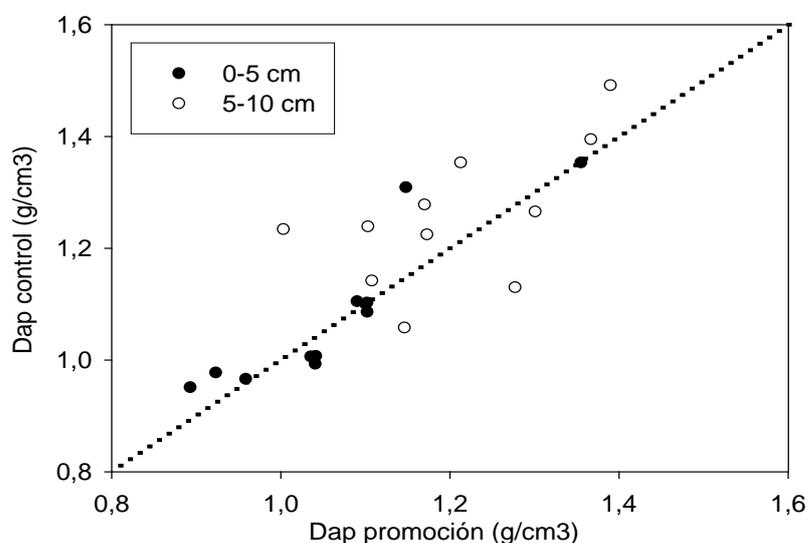


Figura 5: Densidad aparente (Dap) de 0-5 cm y de 5-10 cm de profundidad, en promoción y en pastizal natural control. Cada punto representa un sitio muestreado. La línea de puntos indica la relación 1:1.

5. RESULTADOS

En este capítulo se detalla cómo las técnicas de manejos englobadas dentro de “promoción de especies invernales” afectaron la proporción de carbono de origen C_3 en las distintas fracciones de la materia orgánica del suelo, y su relación C/N, y cómo esto se asoció con efectos sobre el nitrógeno potencialmente mineralizable y el nivel del isótopo ^{15}N . A continuación se describe cómo se modificó el tamaño de los pools de carbono y nitrógeno de la materia orgánica, explorando la relación entre estas modificaciones y el indicador de potencial de mineralización de nitrógeno utilizado. Finalmente se comparan las respuestas obtenidas en la región litoral (clima subtropical) y en la región bonaerense (clima templado).

5.1 $\delta^{13}C$ y proporción de carbono derivado de especies C_3

La práctica de promoción aumentó la proporción de carbono de origen C_3 de la materia orgánica del suelo, respecto a los pastizales naturales control. Para el total de los sitios muestreados, el aumento promedio fue 26% ($p < 0,001$) en la fracción particulada gruesa, que es la que refleja de manera más aproximada el carbono de origen vegetal recientemente incorporado al suelo, 14% ($p < 0,001$) en la fracción particulada fina, y solo 4% ($p = 0,009$) en la fracción asociada a minerales (Figura 6). Considerando la totalidad de la materia orgánica del suelo, el cambio promedio fue de 10% ($p < 0,001$). Esto significó que en la fracción particulada gruesa se observó un incremento promedio del %C- C_3 de 32% a 61% en la región Litoral ($p = 0,024$) y de 67% a 91% ($p < 0,001$) en la región Bonaerense, mientras que en la fracción particulada fina fue de 30% a 46% ($p = 0,004$) y de 71% a 82% ($p = 0,003$), respectivamente.

Se observó una mayor variabilidad en la fracción particulada gruesa en la región Litoral, debida a que, inesperadamente, la proporción de carbono derivado de especies C_3 en el sitio 6 (Entre Ríos) no aumentó con la promoción. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre regiones, en la fracción asociada a minerales de la región litoral, la proporción de carbono de origen C_3 aumentó levemente de 26% a 32% ($p = 0,019$), mientras que en la región Bonaerense fue de solo 66% a 69% ($p = 0,244$). En la materia orgánica del suelo total, el aumento fue de 28% a 40% en la región Litoral y de 67% a 76% en la Bonaerense.

Como las promociones muestreadas tenían diferente duración, se estimó la tasa de cambio anual en la proporción de carbono de origen C_3 . Esta tasa mostró ser constante en Buenos Aires, y aumentar en función de la temperatura y precipitación

en el litoral (Figura 7). En ninguno de los dos casos la tasa de recambio dependió de la cantidad de nitrógeno agregado por año (datos no mostrados).

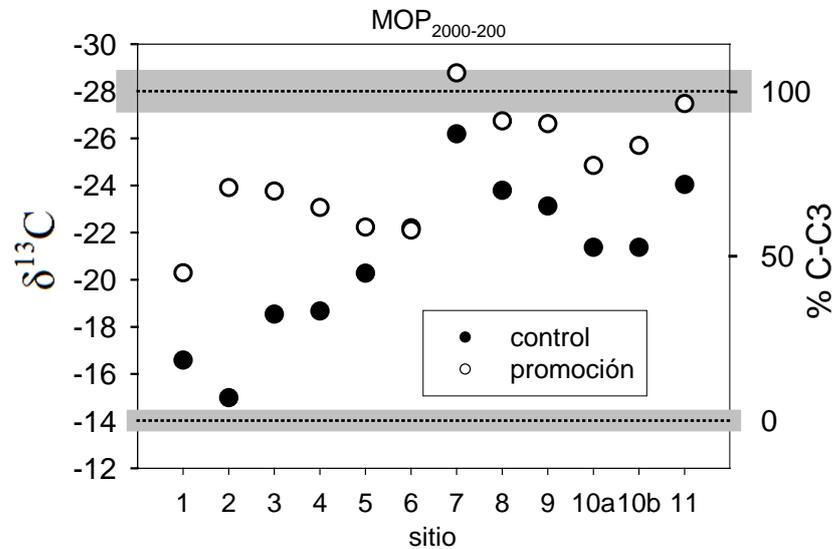


Figura 6: Valor de $\delta^{13}C$ y proporción de carbono de origen C₃ (%C-C₃) en la materia orgánica particulada gruesa (MOP₂₀₀₀₋₂₀₀) del suelo de 0-5 cm, producto del manejo de promoción de especies invernales respecto a pastizales naturales control, para cada sitio muestreado. Los sitios se hallan ordenados de norte a sur.

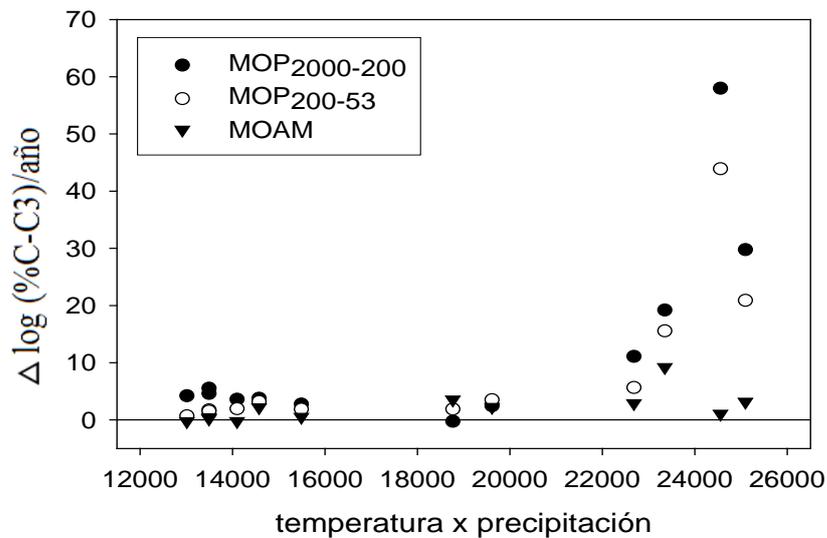


Figura 7: Relación entre la tasa logarítmica de recambio anual de carbono derivado de vegetación C₃ (%C-C₃) y el producto de la temperatura por la precipitación, para la materia orgánica del suelo de 0-5 cm fraccionada por tamaño en particulada gruesa (MOP₂₀₀₀₋₂₀₀), particulada fina (MOP₂₀₀₋₅₃) y asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado. Se utilizaron tasas logarítmicas de cambio anual debido a la distinta antigüedad de la promoción en cada sitio. El parámetro "temperatura x precipitación" aumenta con la latitud, por lo que los sitios se hallan ordenados de sur a norte.

5.2 Relación C/N

La relación C/N de la materia orgánica particulada disminuyó bajo manejo de promoción de especies invernales respecto a pastizales naturales control. Los incrementos observados en la proporción de carbono C_3 en la fracción particulada gruesa se asociaron con caídas en la relación C/N. Análogamente, la baja o nula magnitud de cambios en $\%C-C_3$ en la fracción asociada a minerales se asociaron con una C/N virtualmente inmutable en esta fracción.

La región litoral presentó una mayor diferencia que la región bonaerense en la relación C/N de la fracción particulada gruesa entre promoción y control ($p=0,036$). La disminución promedio, en el primer caso, fue de 6 ($p=0,010$) unidades de carbono por unidad de nitrógeno, desde 24 en el pastizal control a 18 en la promoción. En el segundo caso la disminución promedio fue de solo 2 unidades ($p=0,004$), desde 18 a 16. Para la fracción particulada fina, únicamente hubo un cambio significativo en la región litoral, aunque también en este caso la disminución promedio fue de solo 2 unidades ($p=0,035$), desde 15 a 13. En la región bonaerense la disminución promedio fue de apenas 0,6 unidades ($p=0,053$), manteniendo el control y la promoción un valor cercano a 12. La relación C/N de la fracción asociada a minerales no fue afectada por la promoción y mostró valores similares para todo el gradiente de latitud, en un rango de 9 a 10 unidades de carbono por unidad de nitrógeno (Figura 8). La disminución de la relación C/N en la materia orgánica total fue significativa, pero menor a 1 unidad de carbono por unidad de nitrógeno ($p<0,001$) y similar para ambas regiones.

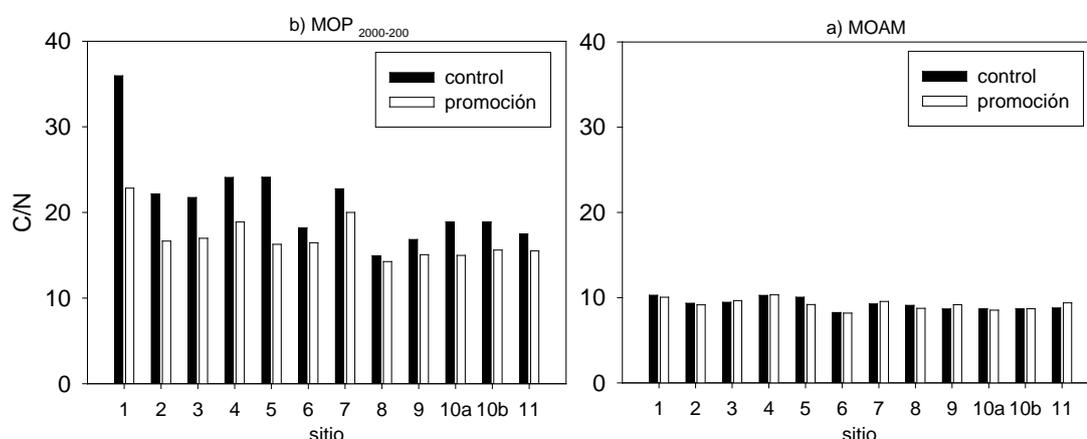


Figura 8: Relación C/N para la fracción de materia orgánica a) particulada gruesa ($MOP_{200-2000}$) y b) asociada a minerales (MOAM) para suelo de 0-5 cm perteneciente a pastizales naturales control y a lotes bajo manejo de promoción de especies invernales, ordenados por sitio. La fracción particulada fina (MOP_{53-200}), con un comportamiento intermedio a las otras dos, no fue graficada con el objetivo de simplificar la visualización de la figura.

Para cuantificar la relación entre el cambio en la proporción de carbono C_3 y el cambio en la relación C/N se calculó la correlación entre estas variables, para las distintas fracciones de la materia orgánica. El aumento en la proporción de carbono de origen C_3 coincidió con una disminución en la relación C/N en las fracciones particuladas, en ambas regiones ($p < 0,05$). Naturalmente, este resultado fue más notable en la fracción particulada gruesa ($p < 0,05$), compuesta por material incorporado más recientemente, un poco menos en la fracción particulada fina y casi nulo en la fracción asociada a minerales (Figura 9).

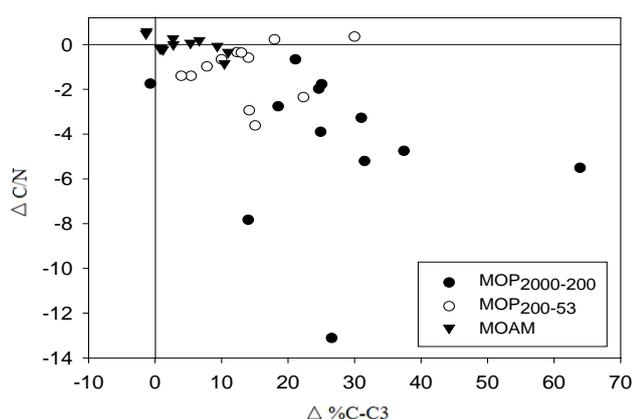


Figura 9: Diferencia en la relación C/N en función de la diferencia en carbono de origen C_3 ($\Delta \%C-C_3$) en promoción respecto a pastizal natural control, para materia orgánica de 0-5 cm, fraccionada por tamaño en particulada gruesa ($MOP_{2000-200}$) particulada fina (MOP_{200-53}) y asociada a minerales (MOAM). ($\Delta C/N$: C/N promoción – C/N control. Valores negativos indican que la relación C/N es menor en la promoción).

Además del cambio en la proporción de carbono de origen C_3 , la disponibilidad de nitrógeno es otro factor que afecta la relación C/N. Para analizar este efecto se relacionó la tasa de cambio en C/N por unidad de cambio en carbono C_3 , con la cantidad total de nitrógeno aplicado. La magnitud de la disminución de la relación C/N por unidad porcentual de cambio en la proporción de carbono derivado de especies C_3 en las promociones, no aumentó con la cantidad de nitrógeno aplicado en ninguna de las fracciones (Figura 10).

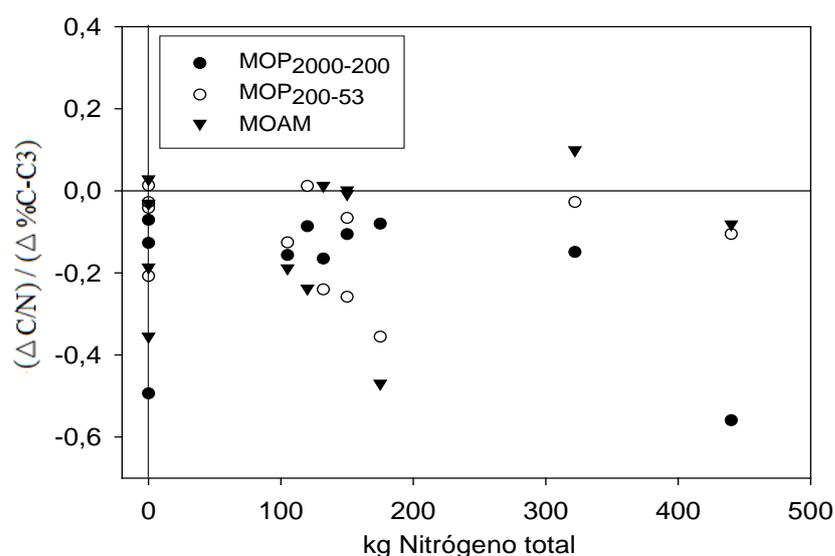


Figura 10: Diferencia en la relación C/N por unidad porcentual de cambio en la proporción de carbono C_3 ($\Delta C/N / \Delta \%C-C_3$) en promoción respecto a pastizal natural control, en función de la cantidad de nitrógeno aplicado. Se diferencia para las tres fracciones en que se separó por tamaño la materia orgánica del suelo de 0-5 cm. ($\Delta C/N / \Delta \%C-C_3 = (C/N \text{ promoción} - C/N \text{ control}) / (\%C-C_3 \text{ promoción} - \%C-C_3 \text{ control})$). Valores negativos indican que la relación C/N es menor en la promoción).

5.3 Nitrógeno potencialmente mineralizable

No se observaron aumentos generalizados en nitrógeno potencialmente mineralizable en respuesta al cambio en la proporción de especies C_3/C_4 . Por el contrario, en 10 de las 12 promociones muestreadas el nitrógeno potencialmente mineralizable tendió a disminuir en relación al pastizal natural control (Figura 11).

El nitrógeno potencialmente mineralizable en el tratamiento promoción disminuyó en promedio $16,7 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ suelo}^{-1}$ ($p=0,032$) respecto al pastizal natural control, considerando el total de los sitios muestreados. Esto se debió en gran parte a una disminución notoria en las promociones de la región bonaerense, de $27 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ suelo}^{-1}$ ($p=0,027$). Mientras tanto, en la región Litoral la diferencia promedio entre el nitrógeno potencialmente mineralizable de las promociones y el pastizal natural control no fue significativamente distinta de cero, ya que la disminución fue de apenas $-0,44 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1} \text{ suelo}^{-1}$ ($p=0,52$), debido a que los dos sitios donde el nitrógeno potencialmente mineralizable fue mayor en promoción se encuentran en esta región.

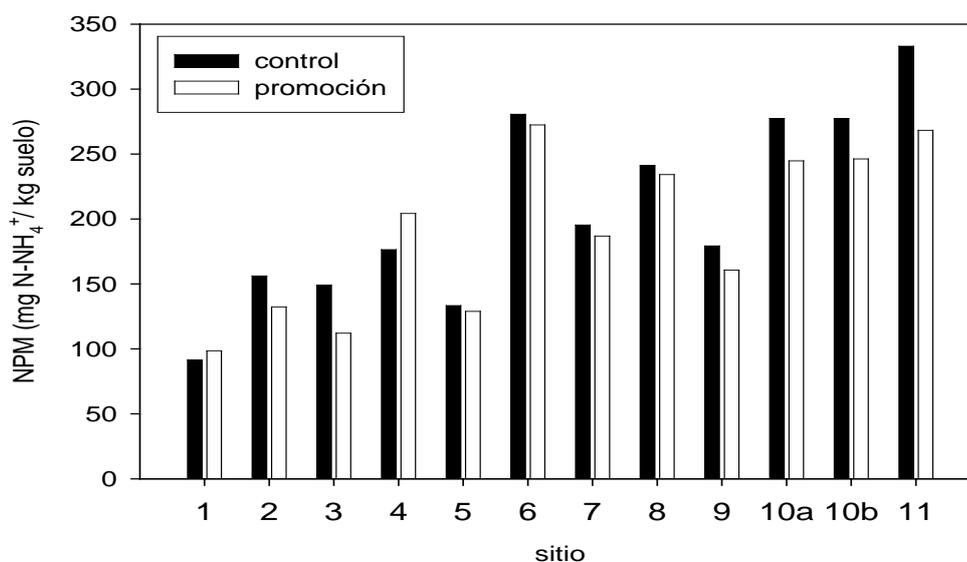


Figura 11: Nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) en suelo de 0-5 cm de promoción y pastizal natural control, para cada sitio muestreado.

Estas respuestas en nitrógeno potencialmente mineralizable no se asociaron con cambios en C/N: las promociones con mayores caídas en la relación C/N en las fracciones particuladas se correspondieron con cambios de menos de 7 mg N- NH₄⁺ kg⁻¹ suelo⁻¹ en NPM, mientras otras con caídas leves en C/N disminuyeron más de 60 mg N- NH₄⁺ kg⁻¹ suelo⁻¹. Tampoco hubo asociación entre diferencias relativas en nitrógeno potencialmente mineralizable y años de promoción o agregado de fertilizantes nitrogenados (datos no presentados).

5.4 δ¹⁵N

El contenido del isótopo ¹⁵N de la materia orgánica del suelo donde se realizó manejo de promoción de especies invernales aumentó respecto al pastizal natural control. La fracción de materia orgánica donde se observó un mayor aumento relativo del valor δ¹⁵N fue la particulada gruesa, de 40% (p=0,005). En contraste, se observó un aumento no significativo de 9% (p=0,143) en la particulada fina y 7% (p=0,102) en la asociada a minerales. Como resultado, la materia orgánica total del suelo de 0-5 cm de las promociones se enriqueció 12% (p=0,011) en ¹⁵N, respecto a la del pastizal natural control.

Las diferencias relativas de δ¹⁵N en la materia orgánica de la fracción particulada gruesa fue similar entre regiones (p=0,658). No obstante, mientras que en el litoral aumentó significativamente 46% (p=0,043), en Buenos Aires el aumento fue un poco

menor y no significativo, de 35% ($p=0,091$). También fue similar entre regiones para la fracción particulada fina ($p=0,907$), con aumentos no significativos de 8% ($p=0,416$) en el litoral y de 9% ($p=0,249$) en Buenos Aires. Al revés de lo ocurrido en la primera fracción y a pesar de que tampoco hubo diferencias importantes entre regiones ($p=0,174$), en la asociada a minerales no aumentó en la región litoral (2%, $p=0,751$) y aumento de forma no significativa en Buenos Aires (13%, $p=0,088$). Estas pequeñas diferencias, provocaron que el aumento relativo de $\delta^{15}\text{N}$ en la materia orgánica total del suelo de las promociones respecto al control, tendiera a ser distinto entre regiones ($p=0,056$), alcanzando un valor de 20% ($p=0,020$) en Buenos Aires y apenas 5% ($p=0,262$) en el litoral. Los valores absolutos de $\delta^{15}\text{N}$ para promoción y control en las fracciones particulada gruesa y asociada a minerales, para cada sitio, se muestran en la Figura 12.

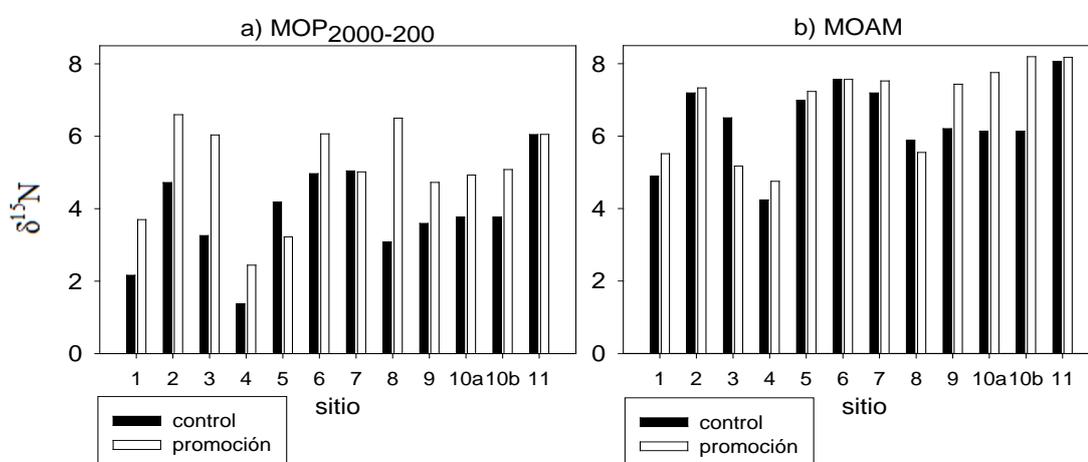


Figura 12: Composición isotópica del nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las fracciones separadas por tamaño, (a) particulada gruesa ($\text{MOP}_{2000-53}$) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado.

Existió una correlación negativa entre los cambios en $\delta^{15}\text{N}$ en la fracción particulada gruesa y la cantidad de nitrógeno total agregado a lo largo de los años que se realizó la promoción ($R^2=0,70$, $p<0,05$; Figura 13). Esta correlación se debió probablemente al hecho de que el nitrógeno que compone el fertilizante agregado proviene de la atmósfera, con un valor de $\delta^{15}\text{N}$ cercano a cero. A pesar de las bajas dosis utilizadas, esto contrarrestó el enriquecimiento en ^{15}N que se produjo por volatilización y distorsiona el uso de $\delta^{15}\text{N}$ como indicador en estos casos, ya que subestima la magnitud de este proceso. Esto explicaría que a diferencia de la tendencia general, el $\delta^{15}\text{N}$ no haya variado o incluso disminuido en los tres sitios que

recibieron relativamente alta cantidad de nitrógeno. Los cambios en $\delta^{15}\text{N}$ en la fracción particulada gruesa no se correlacionaron con aumentos en la relación C/N ($p=0,932$) o en la proporción de carbono de origen C_3 ($p=0,263$; datos no mostrados).

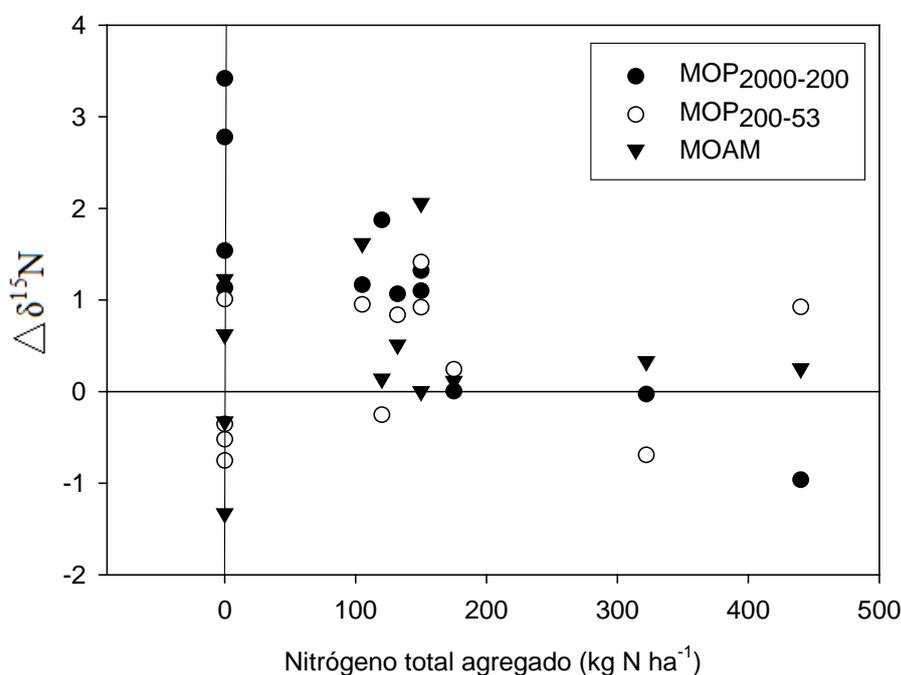


Figura 13: Cambio en el contenido del isótopo ^{15}N ($\Delta \delta^{15}\text{N}$) en función de la cantidad total de nitrógeno agregado (kg N ha^{-1}) en promoción respecto a pastizal natural control, para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada por tamaño en particulada gruesa (MOP₂₀₀₀₋₂₀₀), particulada fina (MOP₂₀₀₋₅₃) y asociada a minerales (MOAM). ($\Delta \delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}$ promoción - $\delta^{15}\text{N}$ control). Valores positivos indican que el valor de $\delta^{15}\text{N}$ es mayor en la promoción).

5.5 Tamaño de los pools de materia orgánica

Debido al comportamiento similar de las fracciones particulada gruesa y particulada fina, en este apartado se utilizó la suma ponderada de ambas con el objetivo de simplificar la comparación de los resultados y la visualización de las figuras. De esta manera, la comparación entre variables se realizó para las fracciones particulada y asociada a minerales.

5.5.1 Carbono

En la fracción particulada y para todos los sitios, la cantidad promedio relativa de carbono disminuyó 14% en las promociones ($p=0,027$) respecto al pastizal natural control y de manera similar entre regiones (-13% y -14%; $p=0,937$). A excepción del sitio 1, que aumentó y de los sitios 6 y 8 que casi no variaron, en las nueve promociones restantes la cantidad de carbono en esta fracción disminuyó, respecto al

pastizal natural control. Debido a que el sitio 1 se encuentra en el litoral, la disminución registrada no fue significativa en esta región (de 16,7 a 13,8 g C kg⁻¹ suelo⁻¹; p=0,249) mientras que si lo fue en la bonaerense (30 a 26,1 g C kg⁻¹ suelo⁻¹; p=0,03; Figura 14)

A diferencia de la anterior, la respuesta en la fracción asociada a minerales fue opuesta entre regiones (p=0,005). Mientras que en la región bonaerense la cantidad relativa de carbono en las promociones aumentó en promedio 35% (de 19,9 a 25,4 g C kg⁻¹ suelo⁻¹; p=0,011) respecto al pastizal control, en el litoral no varió significativamente (-6%, de 25 a 23,1 g C kg⁻¹ suelo⁻¹; p=0,459).

Es importante notar que la distribución de carbono en las distintas fracciones es diferente entre regiones. En pastizales naturales de la región bonaerense el 60% del carbono se encuentra en la fracción particulada y el 40% restante en la asociada a minerales. Con la promoción esta distribución se equilibró, de manera que la disminución de la cantidad de carbono en la fracción particulada fue compensada casi exactamente con el aumento en la fracción asociada a minerales en la mayoría de los sitios, dando como resultado una variación menos del 6% en el carbono total de 0-5 cm (p=0,288) respecto al control.

En los pastizales naturales del litoral la distribución es totalmente inversa, 40% en la fracción particulada y 60% en la asociada a minerales. La promoción prácticamente no afecta esta distribución, debido a que en la mayoría de los sitios de esta región, disminuciones en la cantidad de carbono en la fracción particulada no solo no son compensadas por aumentos en la otra, sino que en algunos casos, inclusive, también disminuyen.

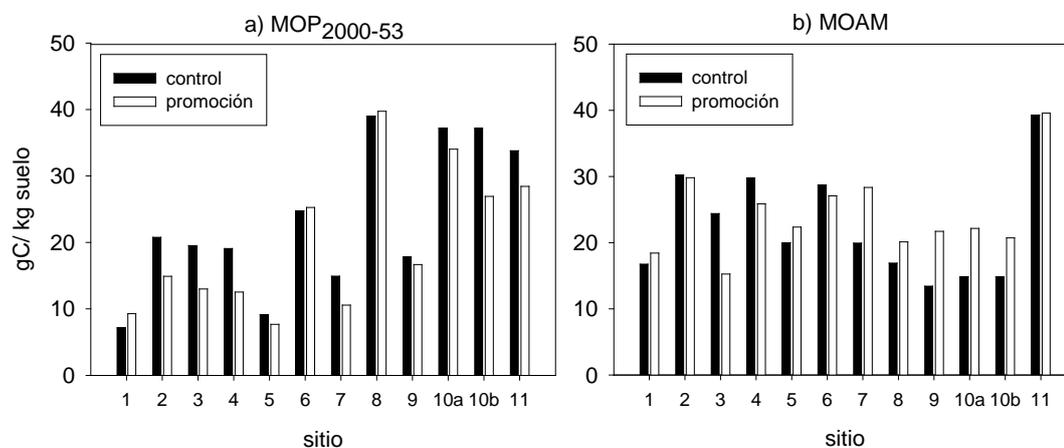


Figura 14: Contenido de carbono (g C kg⁻¹ suelo⁻¹) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las fracciones separadas por tamaño: (a) particulada gruesa (MOP₂₀₀₀₋₅₃) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado.

5.5.2 Nitrógeno

La promoción no modificó significativamente la cantidad promedio de nitrógeno en la fracción particulada, respecto al pastizal natural control. Este resultado fue similar para ambas regiones ($p=0,476$), con aumento relativo de apenas 5% ($0,97$ y $0,93$ gN kg^{-1} suelo $^{-1}$; $p=0,733$) en la región litoral y una disminución de 6% ($2,24$ y $2,15$ gN kg^{-1} suelo $^{-1}$; $p=0,285$) en la bonaerense (Figura 15).

El cambio en la cantidad de nitrógeno en la fracción asociada a minerales fue opuesta entre regiones ($p=0,014$). En la región litoral la cantidad de nitrógeno no se modificó significativamente (-4%, de $2,64$ a $2,49$ g N kg^{-1} suelo $^{-1}$; $p=0,694$). En Buenos Aires, por el contrario, la cantidad de nitrógeno en esta fracción aumentó 34% (de $2,24$ a $2,81$ g N kg^{-1} suelo $^{-1}$; $p=0,014$) en las promociones respecto a los pastizales naturales control. Como consecuencia de este aumento, el contenido de nitrógeno en la materia orgánica total para el suelo de 0-5 cm, aumentó en promedio 13% ($p=0,050$) respecto al pastizal control.

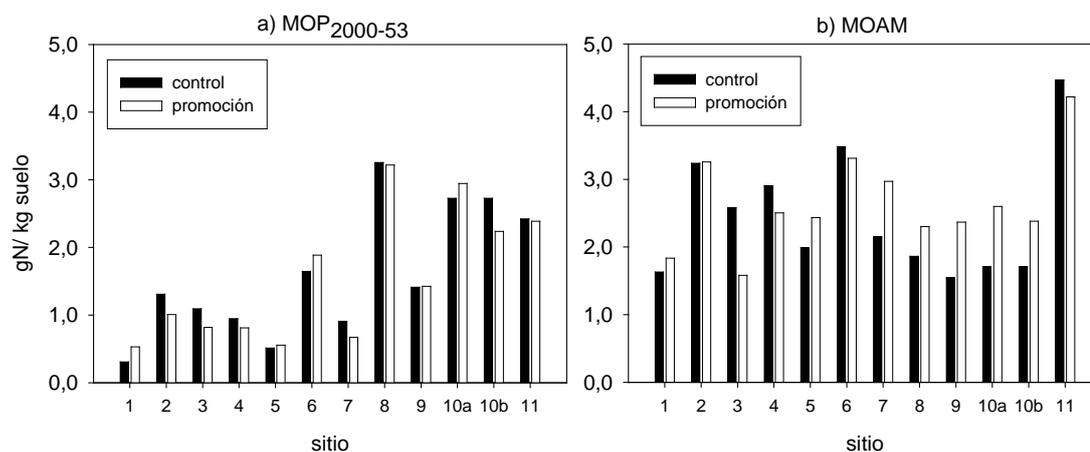


Figura 15: Contenido de nitrógeno (g N/ kg suelo) de la materia orgánica de 0-5 cm del suelo de pastizal natural control y promoción, correspondiente a las fracciones separadas por tamaño: (a) particulada gruesa ($\text{MOP}_{2000-53}$) y (b) asociada a minerales (MOAM), para cada sitio muestreado.

5.5.3 Relación entre nitrógeno potencialmente mineralizable y la cantidad de carbono y nitrógeno en la materia orgánica particulada

La magnitud del nitrógeno potencialmente mineralizable estuvo fuertemente correlacionada con la cantidad de carbono y nitrógeno presente en la fracción particulada, tanto en promociones como en pastizales control. No obstante, no hubo correlación entre el nitrógeno potencialmente mineralizable y la cantidad de carbono o nitrógeno presente en la fracción asociada a minerales (**Figura 16**).

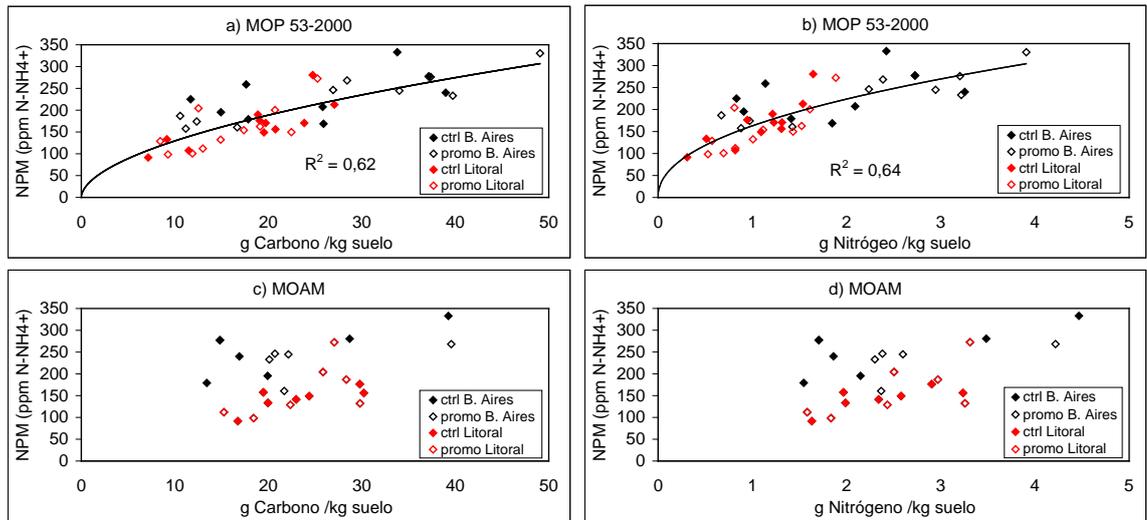


Figura 16: nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) en función de la cantidad de carbono (a y c) o cantidad de nitrógeno (b y d) para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada en particulada (MOP₅₃₋₂₀₀₀) y asociada a minerales (MOAM). En cada caso se trazó una regresión potencial sobre el total de los puntos (a: $p < 0,001$, $R^2 = 0,62$; b: $p < 0,001$, $R^2 = 0,64$; c: $p = 0,3979$, $R^2 = 0,018$; d: $p = 0,0496$, $R^2 = 0,093$). Cada punto corresponde a un lote muestreado, diferenciado por situación de manejo (promoción o control) y región (litoral o bonaerense).

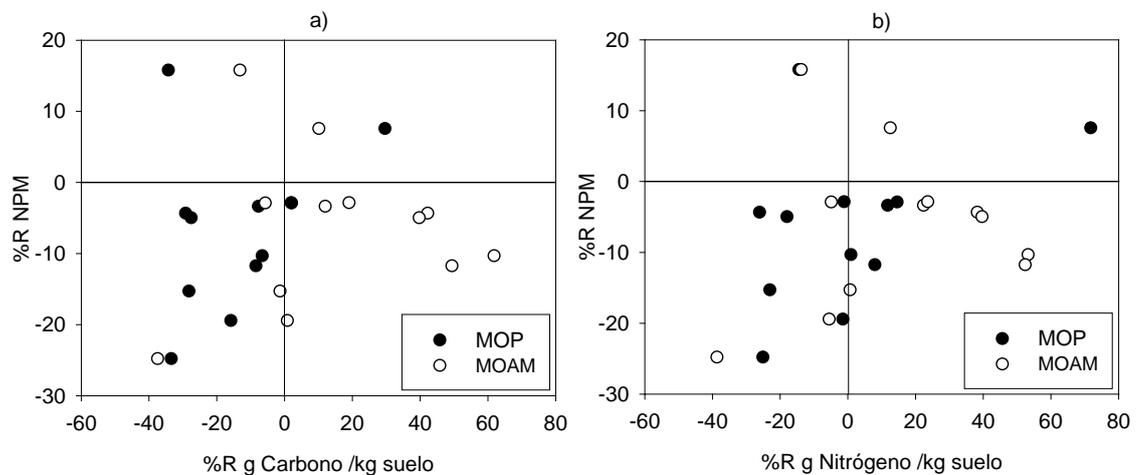


Figura 17: Cambio relativo de nitrógeno potencialmente mineralizable (%R NPM) en función de la diferencia relativa en la cantidad de a) carbono (%R g Carbono kg^{-1} suelo $^{-1}$) y b) nitrógeno (%R g Nitrógeno kg^{-1} suelo $^{-1}$) de las promociones respecto al pastizal control, para materia orgánica de 0-5 cm fraccionada en particulada (MOP₅₃₋₂₀₀₀) y asociada a minerales (MOAM). ($R = (\text{promoción} - \text{control}) / \text{control}$. Valores negativos indican menor nitrógeno potencialmente mineralizable, cantidad de carbono o nitrógeno en promoción).

En la mayoría de las promociones donde el nitrógeno potencialmente mineralizable disminuyó, esto estuvo asociado a una simultánea disminución del contenido de carbono en la fracción particulada y un aumento en la fracción asociada a minerales (Figura 4). Como resultado, el contenido de carbono total en el suelo de 0-5 cm se modificó menos de 12% en 8 de estos 9 casos. De manera coherente con este patrón, en uno de los sitios, el nitrógeno potencialmente mineralizable aumentó en la promoción y también lo hizo el contenido de carbono en la materia orgánica particulada. Una sola promoción se apartó de este comportamiento, ya que aumentó el nitrógeno potencialmente mineralizable pero disminuyó el contenido de carbono en todas las fracciones.

Es importante destacar que si bien el sentido de los cambios en promoción respecto al control siguió el patrón descrito anteriormente, no existió una clara correlación en la magnitud de los cambios entre las variables analizadas (i.e. las promociones con mayores diferencias en contenidos de carbono no se correspondieron con los menores valores de NPM).

6. DISCUSIÓN

Este trabajo presenta cuatro resultados principales, resumidos en la figura 18.

Primero, aumentos en la proporción de especies C_3 se asociaron con caídas en la relación C/N del material vegetal que se incorpora a la materia orgánica del suelo. Sin embargo, la magnitud de esta caída no se relacionó con el nivel de fertilizante nitrogenado agregado. Así, los resultados corroboran la primera hipótesis planteada, que proponía que el aumento de la proporción de especies C_3 en un pastizal mixto C_3 - C_4 reduce la relación C/N de las fracciones más jóvenes de materia orgánica del suelo, pero no la segunda que predecía que dicha reducción se acentúa cuando se fertiliza con nitrógeno.

Segundo, aumentos en la proporción de especies C_3 no se asociaron con una mayor cantidad de Nitrógeno potencialmente de mineralizable. Este parámetro estuvo más asociado con cambios en la cantidad total de carbono de la fracción particulada que con la relación C/N de ese material. Esto refuta la tercera hipótesis, que preveía que, al reducir la relación C/N de la materia orgánica del suelo, el aumento en la proporción de especies C_3 estaría asociado a una mayor capacidad de mineralizar nitrógeno.

Tercero, aumentos en la proporción de especies C_3 se asociaron con aumentos en $\delta^{15}N$, y en consecuencia, posiblemente con incrementos en la proporción de nitrógeno perdido *vía* volatilización. Este hecho es contra intuitivo con la noción de un menor potencial para mineralizar nitrógeno lo cual determinaría menores concentraciones de nitrógeno inorgánico en la solución del suelo. En la interpretación de estos resultados, tanto al inferir sus causas como al compararlos con estudios previos, aparece con influencia determinante la presencia de rumiantes pastoreando estos pastizales.

Cuarto, los resultados mostraron las mismas tendencias generales en pastizales de la región bonaerense, con clima templado y vegetación dominada por especies C_3 , y en pastizales del Litoral, con condiciones más subtropicales y vegetación con mayor proporción de especies C_4 . Esto sustancia la cuarta hipótesis, que preveía que las respuestas a cambios en vegetación C_3/C_4 se mantendrían para un amplio rango de condiciones climáticas y tipos de suelo.

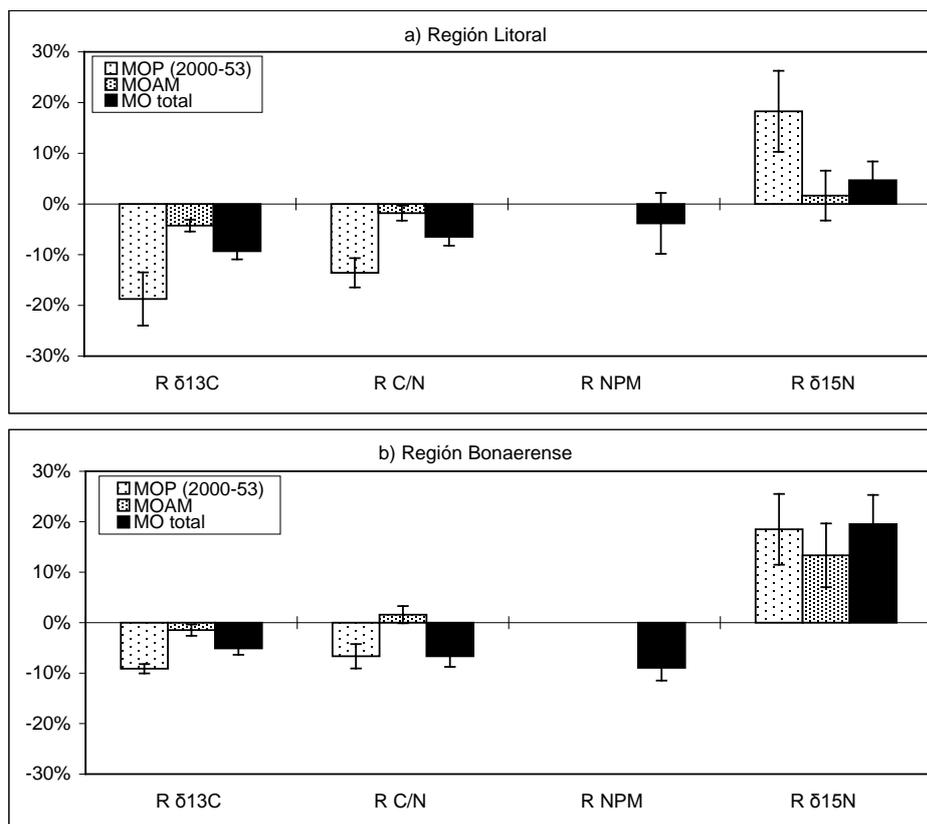


Figura 18: Cambios relativos promedio (R) \pm error estándar para $\delta^{13}\text{C}$, C/N, NPM y $\delta^{15}\text{N}$, para materia orgánica total (MO total) de 0-5 cm y fraccionada por tamaño en particulada (MOP₂₀₀₀₋₅₃) y asociada a minerales (MOAM), para la región a) litoral y b) bonaerense. (R = (promoción - control)/ control). Un valor negativo indica menor valor de la variable en promoción).

6.1 Aumentos en la proporción de especies C_3 están asociados a mejoras en la calidad del material vegetal que entra al suelo.

El aumento en la proporción de especies C_3 trajo aparejado una menor relación C/N (Figura 9), mayormente en la fracción particulada, de alta tasa de ciclado, y en menor medida en la fracción asociada a minerales, de más lento recambio (Figura 8, Hassink et al., 1997; Henderson et al., 2004). Al contrario, no hubo evidencias que indiquen que la fertilización con nitrógeno acentuó este cambio, ya que la disminución en la relación C/N por cada unidad porcentual de incremento en la proporción de carbono C_3 en las promociones no fertilizadas, fueron similares a las fertilizadas (Figura 10). Este resultado podría ser producto de las bajas dosis utilizadas en promociones y de la dilución del N a medida que se acumula forraje (Greenwood et al., 1990).

Mientras que el incremento en la proporción de especies C_3 fue similar en la región bonaerense y en el litoral, la disminución de la relación C/N en la fracción particulada gruesa fue mayor en esta última. Así, un aumento de 10 unidades porcentuales en la proporción de carbono de especies C_3 se asoció a una caída de 1 y 2,5 de unidades en la relación C/N en Buenos Aires y en el litoral, respectivamente. Asumiendo que la relación C/N de promociones no difirió mucho entre regiones, y considerando la menor variabilidad en la relación C/N entre especies C_3 que C_4 (e.g. Murphy et al., 2002), esto indicaría una mayor relación C/N de la vegetación natural reemplazada en el Litoral que aquella reemplazada en la región Bonaerense.

Desde el punto de vista de la velocidad de descomposición, el aumento de especies C_3 "mejoró la calidad" de los residuos vegetales incorporados a la materia orgánica del suelo. A pesar de la amplia literatura existente acerca de la influencia de la relación C/N sobre el ciclado de nitrógeno (Accoe et al., 2004), no fue posible encontrar estudios previos que permitan comparar directamente estos resultados. Sin embargo, el cambio observado es coherente con reportes del efecto de diferencias en la proporción de especies C_3/C_4 sobre la relación C/N de los detritos o de la materia orgánica del suelo total. Así, Wedin y Tilman (1996) muestran que diferencias de 40% en la proporción de biomasa C_4 entre pastizales naturales del centro-norte de EE.UU., implicaron una diferencia de aproximadamente 10 unidades en la relación C/N de la broza. Mahaney et al. (2008), al analizar la incorporación de especies C_4 con mínimo disturbio del suelo en pastizales dominados por especies C_3 , registraron que aumentos de 10% a 25% en la proporción de carbono de origen C_4 en el estrato 0 - 10 cm de profundidad implicaron aumentos de entre 0,3 unidades y 0,9 unidades en la relación C/N de la materia orgánica total del suelo.

Las hojas verdes de especies C_3 poseen intrínsecamente una mayor concentración de nitrógeno que las hojas C_4 , y por ende una menor relación C/N (Greenwood et al., 1990). Sin embargo, dos factores en parte contrarrestan esta diferencia. Por un lado, la extensiva movilización de nitrógeno durante el proceso de senescencia hace que la diferencia sea mucho menor al comparar la broza que especies C_3 y C_4 producen (e.g. Anten et al., 1995). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con tejidos verdes foliares, no hay razón por la cual la relación C/N de las raíces que mueren y se incorporan a la materia orgánica del suelo sea, *a priori*, diferente entre especies C_3 y C_4 . La magnitud de la variación en la relación C/N observada indicaría, entonces, que la contribución de material foliar verde fue relativamente importante.

En condiciones de no pastoreo, hay muy poca oportunidad para la incorporación directa de restos verdes a la materia orgánica del suelo. El animal en pastoreo cambia radicalmente esta situación: al haber una proporción de hojas verdes que son ingeridas, la calidad del material vegetal que se incorpora a la materia orgánica del suelo, en particular para los estratos más superficiales, depende no solo de la broza y raíces, sino también de las características de las heces. La mayor cantidad de forraje C_3 de alta calidad logrado mediante el manejo de promoción de especies invernales, conlleva a incrementos en la carga animal invernal (Fernandez Grecco, comunicación personal), y probablemente a aumentos en la proporción de nutrientes que regresa al suelo en excreta (Thomas, 1992). La cantidad de nitrógeno excretado en heces es directamente proporcional a la cantidad de materia seca consumida (Mathews et al., 1996), por esto, la relación C/N de las heces disminuye a medida que aumenta la calidad del forraje. Las diferencias en la calidad de la materia orgánica encontradas entre promoción y control es probable que se deban, entonces, a la mayor calidad intrínseca de las especies C_3 potenciada por la influencia del pastoreo.

6.2 Aumentos en la proporción de especies C_3 no están asociados con aumentos en Nitrógeno potencialmente de mineralizable

A pesar de la generalizada disminución en la relación C/N de los detritos incorporados a la materia orgánica del suelo en los pastizales manejados con promoción de especies invernales, el nitrógeno potencialmente mineralizable aumentó solo en dos de las 12 situaciones muestreadas. En las 10 restantes fue similar o inclusive disminuyó, entre un 2,8% y un 24,8%, tanto en la región bonaerense como en el litoral (Figura 11).

Este resultado es aparentemente discordante respecto a la bibliografía existente sobre descomposición de restos vegetales, que indica que una mayor disponibilidad de nitrógeno en el material degradado implica menos limitantes para el crecimiento y actividad de los microorganismos del suelo, y por lo tanto una mayor mineralización (Swift et al., 1979; Hoobie, 1992). Una posible explicación es que, en la mayoría de los sitios analizados, los valores de C/N de la MOP fueron siempre menores a 25, valor considerado como el límite inferior del rango a partir del cual ocurre mineralización neta en muchos trabajos (Paul; Clark, 1996). Esto no significa necesariamente que el NPM aumente, sino solamente que habrá más mineralización que inmovilización de ese NPM.

También parecería contradictorio respecto a numerosos trabajos que muestran que suelos bajo predominio de vegetación C_3 tienen mayor mineralización *in vitro* (Wedin; Pastor, 1993; Dijkstra et al., 2006) o disponibilidad de nitrógeno inorgánico *in situ* (Wedin; Tilman, 1990; 1996) respecto a aquellos bajo dominancia de especies C_4 . Como contrapartida, los escasos trabajos realizados en condiciones similares a las del presente estudio coinciden en indicar una falta de respuesta en mineralización ante cambios en la calidad de los residuos incorporados. Mahaney et al. (2008), por ejemplo, encuentran que 11 años después de incorporar con mínimo disturbio especies C_4 en un pastizal dominado por especies C_3 (*i.e.* un proceso de sentido inverso al de las promociones de especies invernales), incrementos del carbono de origen C_4 estuvieron correlacionados con aumentos significativos en la relación C/N de la materia orgánica total del suelo, pero no implicaron diferencias significativas en la tasa de mineralización de nitrógeno medida *in situ*. Similarmente, forestaciones de 35 años con árboles de hoja caduca sobre pastizales C_3 indujeron una mayor relación C/N en la fracción particulada gruesa de la materia orgánica, pero tampoco cambiaron significativamente el nitrógeno potencialmente mineralizable medido en incubaciones aeróbicas de largo plazo (Billings, 2006).

El factor mas fuertemente correlacionado con la magnitud de nitrógeno potencialmente mineralizable en todos los pastizales y promociones analizadas fue la cantidad absoluta de carbono en la fracción particulada (**Figura 16**). No se encontró evidencia de que esta correlación sea diferente para promociones que para pastizales naturales control, a pesar de que para una misma cantidad de carbono, la promoción tuvo más cantidad de nitrógeno asociado. Tampoco hubo correlación entre nitrógeno potencialmente mineralizable y la cantidad de carbono en la fracción asociada a minerales, a pesar de que esta fracción es el pool más grande de carbono en la mayoría de los casos. Así, la buena correlación entre nitrógeno potencialmente mineralizable y cantidad de carbono en la materia orgánica total se debe únicamente a variaciones en la fracción particulada.

Congruentemente, los cambios observados en nitrógeno potencialmente mineralizable en cada sitio estuvieron correlacionados con cambios en la cantidad carbono particulado (**Figura 16**). Notablemente, la correlación entre cambios en nitrógeno potencialmente mineralizable vs. cambios en MOP_C , aunque con bastante variabilidad (probablemente debido a la cantidad de factores no controlados en las promociones muestreadas), fue más alta que aquella vs. cambios en MOP_N . Esto fue debido a que, dependiendo de la magnitud del cambio en la relación C/N, la

disminución generalizada en MOP_C se asoció con aumento, disminución o falta de variación en MOP_N . Estos resultados reafirman las dudas sobre una relación causal entre nitrógeno potencialmente mineralizable y la relación C/N. En cambio, indicarían que cambios en nitrógeno potencialmente mineralizable estarían determinados por variaciones en la cantidad de carbono en la fracción particulada.

La falta de respuesta del nitrógeno potencialmente mineralizable a la disminución de la relación C/N en los detritos incorporados al suelo en las promociones, podría deberse a que en la mayoría de los pastizales naturales control ésta relación era menor de 30, y por lo tanto, la calidad no era un factor limitante. Esta suposición se basa en el hecho de que la concentración de carbono en la fracción particulada gruesa fue similar en ambos casos, lo que indicaría un similar grado de degradación (Gregorich et al., 2006). Si por el contrario, la calidad hubiera sido limitante, la concentración de carbono en la fracción particulada gruesa debería haber sido menor en los pastizales control que en la promoción.

6.2.1 Posibles causas de disminución de MOP_C

Disminuciones en la cantidad de carbono en la fracción particulada implican una variación en el balance entre entradas y salidas de carbono de esta fracción. En pastizales naturales, la entrada de carbono a la materia orgánica del suelo se sustenta en la senescencia de partes aéreas y subterráneas de la vegetación, y en la excreta del carbono no digerido por los animales en pastoreo (Dubeux et al., 2007). Al estar el carbono de la materia orgánica particulada compuesto en gran medida por restos vegetales (Christensen, 1992; Magid; Kjærgaard, 2001), variaciones en el flujo de carbono que ingresa al suelo afectarían directamente su tamaño (Christensen, 2000). La salida de carbono de la fracción particulada es determinada por la tasa de degradación microbiana de la misma (Six et al., 2001), que implica pérdidas de carbono por respiración (*i.e.* la conversión de material vegetal a CO_2) y por el pasaje hacia fracciones más humificadas y recalcitrantes por síntesis microbiana y bioquímica de los compuestos más difíciles de degradar, así como inmovilización en la biomasa microbiana (Ganjegunte et al., 2005). El presente trabajo no evaluó ninguno de estos procesos, y por ende no cuenta con datos que permitan cuantificar su importancia relativa en las variaciones observadas. Por esto, la presente sección simplemente resume posibles mecanismos y brevemente conjetura sobre su probable relevancia.

Menores entradas de carbono a la fracción particulada pueden deberse a uno o varios de los siguientes factores: menor productividad anual, menor senescencia (*i.e.* mayor consumo animal), menor excreta animal por unidad consumida (*i.e.* mayor digestibilidad del forraje). Además, de ser válido que las partes subterráneas representan en los pastizales la principal entrada de materia orgánica al suelo (con respecto a órganos aéreos, Rice et al., 1998), disminuciones en la partición de carbono hacia raíces harían, también, caer la entrada de carbono a la fracción particulada. Notablemente, ninguna de estas posibilidades es contraria a los efectos que el manejo de promoción de especies invernales tendría sobre los flujos de carbono del pastizal natural. La repetida aplicación de herbicidas totales y eliminación de especies C_4 reduciría las tasas de crecimiento primavero-estivales (Oyhamburu et al., 2000). Además, el reemplazo de especies perennes por otras de ciclo anual privilegiaría el crecimiento aéreo a expensas del subterráneo (Kuzyakov; Domanski, 2000).

Las promociones tienen mejor calidad forrajera y reciben más alta carga animal que los pastizales naturales durante otoño, invierno y principios de primavera (Fernandez Grecco, comunicación personal). Los incrementos en la presión de pastoreo y en la digestibilidad del material vegetal también contribuirían a reducir la entrada de carbono al suelo, ya que llevarían a aumentos en la proporción del crecimiento que es consumido, y por ende una menor producción de material muerto aéreo (Lemaire; Agnusdei, 2000) y a disminuciones en la cantidad del material excretado por unidad consumida (Dubeux et al., 2007). Es probable que también induzcan una reducción en el tamaño de los restos que ingresan al suelo como heces ya que en el rumen especies C_3 y C_4 se degradan de forma diferente (Wilson et al., 1989), y así favorezcan un mayor pasaje de partículas a la fracción MOAM. En este sentido Ganjegunte et al. (2005) reportaron una mayor degradación de lignina y formación de productos microbianos al incrementarse la presión de pastoreo, efecto que adjudicaron a la desintegración parcial de material vegetal por los animales y deposición de heces, más susceptible a descomponerse.

Todos estos efectos se harían más marcados en latitudes menores, donde la ventaja productiva de las especies C_3 está acotada por una estación con bajas temperaturas mas corta (Sage et al., 1999), y la presión de pastoreo y la calidad del forraje invernal son muy bajas en el pastizal natural (Deregibus, 1988) y por ende el cambio con la promoción mas marcado. En realidad, los cambios en la cantidad de carbono en las distintas fracciones de la materia orgánica parecen diferir entre

regiones. En la región bonaerense, la disminución del contenido de carbono en las fracciones particuladas fue totalmente compensado por un aumento simultáneo en la fracción asociada a minerales, lo que habría implicado una estabilización del carbono. Por el contrario, en la región litoral la disminución del contenido de carbono en la fracción particulada no fue compensada por un aumento en el carbono asociado a minerales, y el carbono total tendió a disminuir. Las causas de este comportamiento diferencial podrían estar relacionadas con la mayor tasa de cambio de carbono de las fracciones particuladas y asociada a minerales observada en la región litoral (Figura 7), debido a al efecto favorable de la mayor precipitación y temperatura (**Cuadro 1**) sobre la actividad microbiana (Jarvis et al., 1996).

6.3 Aumentos en la proporción de especies C_3 están asociados a aumentos en $\delta^{15}N$, y posiblemente a incrementos en la proporción de nitrógeno volatilizado

Aumentos en la proporción de especies C_3 , a pesar de que implicaron disminución del nitrógeno potencialmente mineralizable en las promociones, coincidió con aumentos en $\delta^{15}N$ en la fracción particulada. Una de las fuentes más claras de enriquecimiento de ^{15}N en pastizales pastoreados es la volatilización de amoníaco desde los parches de orina (Frank; Evans, 1997). Por esto, el generalizado aumento en $\delta^{15}N$ observado en lotes manejados con promoción de especies invernales sugiere que el cambio hacia vegetación C_3 habría aumentado las pérdidas de nitrógeno por volatilización.

Los aumentos en $\delta^{15}N$ observados podrían ser consecuencia de la mayor calidad del tejido de la vegetación en los manejos de promoción de especies invernales respecto al pastizal control, y de la mayor presión de pastoreo que se realiza sobre ese recurso forrajero durante el invierno. Por un lado, el aumento en la presión de pastoreo implica que una proporción mayor del nitrógeno es ciclado a través del animal en desmedro de la senescencia. Por otro lado, aumentos en el contenido de nitrógeno y en la digestibilidad del forraje incrementan la proporción de nitrógeno que se excreta por orina, debido a que la cantidad de nitrógeno en heces se mantiene constante (Mathews et al., 1996). De esta manera, ambos factores contribuirían a elevar la probabilidad de pérdidas de nitrógeno.

A pesar del indicio de incrementos en la proporción de nitrógeno volatilizado que proporciona el aumento de $\delta^{15}N$, es necesario ser cauteloso en no extrapolar esta inferencia a todo el perfil del suelo. La cantidad total de nitrógeno no varió o inclusive

tendió a aumentar en el estrato analizado de 0-5 cm, sugiriendo que, o bien otras rutas de pérdida de nitrógeno disminuyeron en importancia (e.g. lavado de nitrato), o bien las pérdidas fueron compensadas por removilización de nitrógeno desde estratos más profundos y/o a partir de la retención del nitrógeno agregado en las promociones fertilizadas.

Otro factor que podría haber contribuido a aumentar el $\delta^{15}\text{N}$ en las promociones es una cesación de la fijación biológica que realiza la población de *Rhizobium* asociada a leguminosas, a partir del nitrógeno del aire. Este proceso disminuye el $\delta^{15}\text{N}$, ya que incorpora nitrógeno con un $\delta^{15}\text{N}$ de cero al suelo (Högberg, 1997). De esta manera, la eliminación de leguminosas por acción de herbicidas usados en las promociones podría ser el causante del mayor $\delta^{15}\text{N}$ observado. Sin embargo, por un lado, la presencia de leguminosas no parece cambiar de manera importante con el tratamiento de promoción: promociones de más 8 años en la región Bonaerense mostraron una disminución promedio menor al 30% en el número de leguminosas presentes (Fernández et al., 2007), en otros casos no se registraron modificaciones significativas (Berthold, 2005; Moltoni, 2006). Por otro lado, en uno de los sitios analizados en el que la promoción consistió en la implantación de leguminosas (sitio 3), se observó un aumento en $\delta^{15}\text{N}$ similar al registrado en promociones con raigrás no fertilizadas con nitrógeno. Así, es improbable que este mecanismo explique el enriquecimiento en $\delta^{15}\text{N}$ observado.

7. CONCLUSIONES

- Aumentos en la proporción de especies C_3 en pastizales mixtos C_3 - C_4 se asociaron con disminuciones en la relación C/N de las fracciones más jóvenes de la materia orgánica del suelo, pero contrario a lo esperado, no se asoció con una mayor cantidad de nitrógeno potencialmente mineralizable, sino que este se mantuvo igual o disminuyó
- La magnitud de esta disminución en la relación C/N de la materia orgánica no aumentó al agregar nitrógeno, para los niveles de fertilizante utilizado (menores a $45 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$)
- El nitrógeno potencialmente mineralizable estuvo más asociado con cambios en la cantidad de carbono en las fracciones más jóvenes de la materia orgánica del suelo que con la relación C/N de ese material
- El aumento en la proporción de especies C_3 , a pesar de que implicó la disminución del nitrógeno potencialmente mineralizable, coincidió con aumentos en $\delta^{15}\text{N}$ en las fracciones más jóvenes de la materia orgánica del suelo, indicando cambios en el ciclo de nitrógeno
- Las respuestas observadas a cambios en vegetación C_3/C_4 mostraron las mismas tendencias generales en pastizales de la región bonaerense, con clima templado y vegetación dominada por especies C_3 , y en pastizales del Litoral, con condiciones más subtropicales y vegetación con mayor proporción de especies C_4
- En los cambios observados (en relación C/N de la materia orgánica, nitrógeno potencialmente mineralizable y $\delta^{15}\text{N}$) influiría, no sólo a la mayor calidad intrínseca del tejido verde que producen las especies C_3 , sino también la proporción de uso y procesamiento de ese tejido por el animal en pastoreo, en relación al que se incorpora directamente por senescencia

Por último, para progresar en el entendimiento de las respuestas a cambios en la proporción C_3/C_4 de estos pastizales, se postula que sería necesario un estudio que permita diferenciar el efecto de la cantidad de biomasa aportada del efecto de la relación C/N de dicha biomasa sobre el ciclo de nitrógeno y la dinámica de la materia orgánica que se incorpora en las distintas fracciones. En este sentido, sería también interesante complementar estos resultados con una mejor aproximación a los procesos comprendidos en la mineralización, y analizar el grado de descomposición de la materia orgánica en fracciones jóvenes y viejas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABIVEN, S.; RECOUS, S.; REYES, V.; OLIVER, R. 2005. Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. *Biol Fertil Soils*. 42: 119–128.
- ACCOE, F.; BOECKX, P.; BUSSCHAERT, J.; HOFMAN, G.; VAN CLEEMPUT, O. 2004. Gross transformations rates and net mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grasslands soils of different age. *Soil Biology & Biochemistry*. 36: 2075-2087.
- ANTEN, N.P.R. 2005. Optimal photosynthetic characteristics of Individual plants in vegetation stands and implications for species coexistence. *Annals of Botany*. 95: 495–506.
- ARZADÚN, M.; MESTELAN, S.; VAQUER, M.; LLAMBÍAS, F. 2003. Tratamiento con glifosato o defoliación intensa sobre un pastizal de bajo dulce. 1 Cambios en la composición botánica. *Revista Argentina de Producción Animal*. 23 (1): 204-206.
- BALESDENT, J.; BALABANE, M.1996. Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biol Biochem*. 28: 1261-1263
- BARROW, N.J. 1987. Return of nutrients by animals. En: Snaydon, R.W. ed. *Managed grasslands*. Elsevier, Oxford, Inglaterra. pp. 181-186.
- BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol. Biochem*. 36: 1785–1792.
- BENINTENDE M.C.; BENINTENDE S.M.; STERREN M.A.; MUSANTE C.; SALUZZIO M.; DE BATTISTA J. J. 2004. Incubación anaeróbica del suelo como índice del potencial de mineralización de nitrógeno. *Actas 19° Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y 2° Simposio Nacional de Suelos Vertisolicos, Paraná, Argentina*. pp. 235-236
- BENINTENDE, S.M.; BENINTENDE, M.C.; STERREN, M. A.; DE BATTISTA J.J. 2008. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems ecological indicators. 8: 704 – 708.
- BERENDSE, F. 1994. Litter descomposability – a neglected component of plant fitness. *Journal of Ecology*. 82: 187-190.
- BERTHOLD, M.A. 2005. Efectos del pastoreo con vacunos sobre la estructura y el funcionamiento de un pastizal de media loma de la Pampa Deprimida Bonaerense. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 50 p.
- BILLINGS, S.A. 2006. Soil organic matter dynamics and land use change at a grassland/forest ecotone. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 2934–2943.
- BLAKE, G.R.; HARTGE, K.H. 1986. Particle density. En: Klute, A. ed. *Methods of soil analysis*. 2nd ed Vol.1. ASA and SSSA. Madison, Wisconsin, EE.UU. pp. 363-375.

- BOUTTON, T.W. 1996. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. En: Boutton, T.W.; Yamasaki, S.I. eds. Mass spectrometry of soils. Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU. pp. 46-82.
- CALVIÑO, P.A.; ECHEVERRÍA, H.E. 2003. Incubación anaeróbica del suelo como diagnóstico de la respuesta a nitrógeno del maíz bajo siembra directa. *Ciencia del Suelo*. 21: 24-29.
- CHRISTENSEN, B.T. 1992. Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science*. 20: 1-87.
- CHRISTENSEN, B.T. 2000. Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. Eurosoil conference, University of Reading, British Society of Soil Science. 16 p.
- DEREGIBUS, V.A. 1988. Importancia de los pastizales naturales en la Republica Argentina: situación presente y futura. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8(1): 67-78.
- DEREGIBUS, V.A. 2000. Argentina's humid grazing lands. En: Lemaire, L.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Nabinger, C.; Carvalho, P.C. eds. *Grasslands ecophysiology and grazing ecology*. CAB internacional, New York, EE.UU. pp. 395-406.
- DIJKSTRA, F.A.; HOBBIE, S.E.; REICH, P.B. 2006. Soil processes affected by sixteen grassland species grown under different environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70: 770-777.
- DOAK, B.W. 1952. Some chemical changes in the nitrogenous constituents of urine when voided to pasture. *J. Agric. Sci.* 42: 162-171.
- DOMÍNGUEZ, G.F.; STUDDERT, G.A.; COZZOLI, M.V.; DIOVISLAVI, N.V. 2006. Relación entre el nitrógeno potencialmente mineralizable y el rendimiento de maíz. *Actas 20° Cong. Arg. Ciencia del Suelo, Salta-Jujuy, Argentina*. En CD.
- DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. 1994. Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA, Madison, EE.UU. Spec. Publ. 35. pp. 3-21.
- DORAN, J.W.; JONES, A.J. 1996. *Methods for assessing soil quality*. SSSA, Madison, EE.UU. Spec. Publ. 49. 410 p.
- DUBEUX, J.C.B. Jr.; SOLLENBERGER, L.E.; MATHEWS, B.W.; SCHOLBERG, J.M.; SANTOS, H.Q. 2007. Nutrient Cycling in Warm-Climature Grasslands. *Crop Science*. 47: 915-928.
- DUBEUX, J.C.B. Jr.; SOLLENBERGER, L.E.; MATHEWS, B.W.; SCHOLBERG, J.M.; SANTOS, H.Q. 2007. Nutrient cycling in warm-climate grasslands. *Crop Sci.* 47: 915-928.
- ECHEVERRÍA, H.E.; SAN MARTIN, N.F.; BERGONZI, R. 2000. Métodos rápidos de estimación de nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos. *Ciencia del Suelo*. 18 (1): 9 -16

- FABRIZZI, K.P.; MORÓN, A.; GARCÍA, F.O. 2003. Soil carbon and nitrogen organic fractions in degraded vs. non-degraded Mollisols in Argentina. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67: 1834-1841.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R.; HUBICK, K.T. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 40: 503-537.
- FARRUGGIA, A.; GASTAL, F.; SCHOLEFIELD, D. 2004. Assessment of the nitrogen status of grassland. *Grass and Forage Science*. 59: 113–120.
- FERNÁNDEZ GRECCO, R.; MAZZANTI, A. 1996. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento primaveral de forraje de un pastizal natural de la Pampa Deprimida Bonaerense. *Revista Argentina de Producción Animal*. 16 (1): 224-225.
- FERNÁNDEZ, O.; AGNUSDEI, M.; COLABELLI, M. R.; VIGNOLIO O. 2007. Impacto de la promoción de raigrás (*Lolium perenne L.*) sobre la estructura y funcionamiento de pastizales de la Pampa deprimida. IV Congreso Nacional-I Congreso del MERCOSUR sobre manejo de pastizales Naturales, Villa Mercedes, Argentina. En CD.
- FERNÁNDEZ, O.N.; PEREIRA, M.; AGNUSDEI, M.G.; COLABELLI, M.; VIGNOLIO, O.R. 2008. Degradación de pastizales asociada a la promoción de raigrás en la Pampa Deprimida. *Revista Argentina de Producción Animal*. 28 (1): 349-543
- FRANK, D.A.; EVANS, R.D. 1997. Effects of native grazers on grassland N cycling in Yellowstone National Park. *Ecology*. 78: 2238–2248.
- FRANK, D.F.; EVANS, R.D.; TRACY, B.F. 2004. The role of ammonia volatilization in controlling the natural ^{15}N abundance of a grazed grassland. *Biogeochemistry*. 68: 169-178.
- GALIMOV, E. M. 1985. The biological fractionation of isotopes. Academic press, New York, EE.UU. pp. 1-15
- GANJEGUNTE, G.K.; VANCE, G.F.; PRESTON, C.M.; SCHUMAN, G.E.; INGRAM, L.J.; STAHL, P.D.; WELKER, J.M. 2005. Soil Organic Carbon Composition in a Northern Mixed-Grass Prairie: Effects of Grazing. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69: 1746–1756.
- GASTAL, F.; LEMAIRE, G. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*. 53: 789–799.
- GAVINELLI, E.; FELLER, C.; LARREÉ-LARROUY, M.C.; BACYE, B.; DJEGUI, N.; NZILA, J.D. 1995. A routine method to study soil organic matter by particle-size fractionation: examples for tropical soils. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* 26: 1749-1760.
- GEE, G.W.; BAUDER, J.W. 1986. Particle size analysis. En: Klute, A. ed. *Methods of soil analysis*. 2nd ed Vol.1. ASA and SSSA. Madison, Wisconsin, USA. pp. 383-409.
- GREENWOOD, D.J.; LEMAIRE, G.; GOSSE, G.; CRUZJ, P.; DRAYCOTT, A.; NEETESON, J.J. 1990. Decline in percentage N of C_3 and C_4 crops with increasing plant mass. *Annals of Botany*. 66: 425-436.

- GREGORICH, E.G.; BEARE, M.H.; MCKIM, U.F.; SKJEMSTAD, J.O. 2006. Chemical and Biological Characteristics of Physically Uncomplexed Organic Matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70: 975–985.
- HART, S.; STARK, J.; DAVIDSON, E.; FIRESTONE, M.K. 1994. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. En: Weaver, R.; Angle, S.; Bottomley, P.; Bezdicek, D.; Smith, S.; Tabatabai, A.; Wollum, A. eds. *Methods of soil analysis, Part 2: Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, EE.UU. pp. 985–1018.
- HASSINK, J.; WHITMORE, A.P.; KUBÁT, J. 1997. Size and density fractionation of soil organic matter and the physical capacity of soils to protect organic matter. *Eur. J. Agron.* 7:189–199.
- HENDERSON, D.C.; ELLERT, B.H.; NAETH, M.A. 2004. Utility of ^{13}C for ecosystem carbon turnover estimation in grazed mixed grass prairie. *Geoderma*. 119: 219–231.
- HIROBE M.; KOBAYASHI, K.; TOKUCHI, N. 2003. Dynamics of the internal soil nitrogen cycles under moder and mull forest floor types on a slope in a *Cryptomeria japonica* (D) Don plantation. *Ecological Research*. 18 (1): 53 – 64.
- HOBBIE S.E. 1992. Effects of plant species on nutrients cycling. *TREE*. 7 (10): 336-339.
- HÖGBERG, P. 1997. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytol.* 137, 179–203.
- JARVIS, S.C.; HATCH, D.J.; ROBERTS, K.H. 1989. The effects of grassland management on nitrogen losses from grazed swards through ammonia volatilization: the relationship to excretal N returns from cattle. *J. Agricultural Science, Cambridge*. 112: 205-216.
- JARVIS, S.C.; STOCKDALE, E.A.; SHEPHERD, M.A.; POWLSON, D.S. 1996. Nitrogen mineralization in temperate agricultural soils: processes and measurements. *Advances in Agronomy*. 57: 187-235.
- KEENEY, D.R. 1982. Nitrogen availability indexes .En: Page, A.L.; Miller R.H.; Keeney, D.R. eds. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and biochemical properties*. Am Soc. Agron. Madison, Wisconsin, EE.UU. pp. 711-733.
- KUZYAKOV, Y.; DOMANSKI, G. 2000. Carbon input by plants into soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 163:421–431.
- LANTINGA, E.A.; KEUNING, J.A.; GROENWOLD, J.; DEENEN, P.J.A.G. 1987. Distribution of excreted nitrogen by grazing cattle and its effects on sward quality, herbage production and utilization. En: van der Meer. H.G.; Unwin, R.J.; van Dijk, T.A.; Enruk, G.C. eds. *Animal Manure on Grassland and fodder Crops: fertilizer or waste?* Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp. 103-117.
- LARSON, W.E.; PIERCE, F.J. 1994. The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. En: Doran, J.W.; J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA, Madison, EE.UU. Spec. Publ. 35. pp. 37–51.

- LEMAIRE, G.; AGNUSDEI, M. 2000. Leaf tissue turnover and efficiency of herbage utilization. En: Lemaire, L.; Hodgson, J.; de Moraes, A.; Nabinger, C.; Carvalho, P.C. eds. *Grasslands Ecophysiology and grazing ecology*. CAB internacional, New York. pp 265-287.
- MACK, M.C.; D'ANTONIO, C. 2003. Exotic grasses alter controls over soil nitrogen dynamics in a Hawaiian woodland. *Ecol Appl.* 13:154–166
- MAGID, J.; KJÆRGAARD, C. 2001. Recovering decomposing plant residues from the particulate soil organic matter fraction: Size versus density separation. *Biol. Fertil. Soils.* 33:252–257.
- MAHANEY, W.M.; SMEMO, K.A.; GROSS, K.L. 2008. Impacts of C4 grass introductions on soil carbon and nitrogen cycling in C₃- dominated successional systems. *Oecologia.* 157 (2): 295 – 305.
- MARIN, A.; MARIOTI, A.; BALESSENT, J.; LAVELLE, P.; VUATTOUX, R. 1990. Estimate of organic matter turnover rate in a savanna soil by super (13) C natural abundance measurements. *Soil Biol. Biochem.* 22: 517-523.
- MARINARI, S.; MANCINELLI, R.; CAMPIGLIA, E.; GREGO, S. 2006. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecol. Indicators.* 6: 701–711.
- MARIOTTI, A.; GERMON, J.C.; LELERC, A. 1982. Nitrogen isotope fractionation associated with the NO₂ – N₂O step of denitrification in soils. *Canadian Journal of Soil Science.* 62: 227–241.
- MASON, V.C. 1969. Some observations on the distribution and origin of N in sheep faeces. *J. Agric. Sci.* 73: 99-111.
- MATHEWS, B.W.; SOLLENBERGER, L.E.; TRITSCHLER, J.P. 1996. Grazing systems and spatial distribution of nutrients in pastures: Soil considerations. En: Joost, R.E. y Roberts, C.A. eds. *Nutrient cycling in forage systems*. PPI/FAR, Columbia, MO. p. 213–229.
- MOLTONI, G.A. 2006. Efectos del pastoreo controlado, sobre aspectos estructurales y funcionales de un pastizal ubicado en bajos húmedos de la Pampa Deprimida Bonaerense. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 54 p.
- MURPHY, K.L.; BURKE, I.C.; VINTON, M.A.; LAUENROTH, W.K.; AGUIAR, M.R.; WEDIN, D.A.; VIRGINIA, R.A.; LOWE, P.N. 2002. Regional analysis of litter quality in the central grassland region of North America. *Journal of Vegetation Science.* 13: 395-402.
- NADELHOFFER, K.J.; FRY, B. 1988. Controls on natural 15N and 13C abundances in forest soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal.* 52: 1633–1640.
- OADES, J.M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma.* 56: 377-400.

- OADES, J.M.; WATERS, A.G. 1991. Aggregate hierarchy in soils. *Australian Journal of Soil Research*. 29: 815–828.
- OSTROMA, N.E.; KNOKEA, K.E.; HEDINB, L.O.; ROBERTSONC, G.P; SMUCKERD, A.J.M. 1998. Temporal trends in nitrogen isotope values of nitrate leaching from an agricultural soil. *Chemical Geology*. 146: 219-227.
- OYHAMBURU, E.M.; BALDO, A.; SILVERTINI, M.P. 2000. Pastizal natural tratado con glifosato y fertilizado con nitrógeno o fosfato diamónico. 2. Composicion floristica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 20(1): 117- 118.
- PALM. C.A.; ROWLAND, A.P. 1997. A minimum dataset for characterization of plant quality for decomposition. En: Cadisch, G.; Giller, K.E. eds. *Driven by Nature: plant litter quality and decomposition*. CAB international, Wallingford, Inglaterra. pp. 379 – 392.
- PARSONS, A.J.; ORR, R.J.; PENNING, P.D.; LOCKYER, D.R. 1991. Uptake, cycling and fate of nitrogen in grass-clover swards continuously grazed by sheep. *J. Agricultural Science, Cambridge*. 116: 47-61.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*, 2nd ed. Academic Press, Toronto, Canadá. 340 p.
- RICE, C.W.; TODD, T.C.; BLAIR, J.M.; SEASTEDT, T.R.; RAMUNDO, R.A.; WILSON, G.W.T. 1998. Belowground biology and processes. En: Knapp, A.K.; Briggs, J.M.; Hartnett, D.C.; Collins, S.L. eds. *Grassland dynamics: long-term ecological research in tallgrass prairie*. Oxford University Press, New York, EE.UU. pp. 244–264
- ROBINSON, D. 2001. $\delta^{15}\text{N}$ as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 153–162.
- SAGE, R.E.; PEARCY, R.W.; SEEMAN, J.R. 1987. The nitrogen use efficiency of C_3 and C_4 plants. 3. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* (L) and *Amaranthus retroflexus* (L). *Plant Physiology* 85: 355-359.
- SAGE, R.F.; WEDIN, D.A.; LI, M. 1999. The biogeography of C_4 photosynthesis: patterns and controlling factors. En: Sage, R.F.; Monson, R.K. eds. *C_4 plant biology*. Academic Press, San Diego, EE.UU. pp. 313-373.
- SAINZ ROZAS, H.; CALVIÑO, P.A.; ECHEVERRÍA H.E.; BARBIERI, P.A.; REDOLATTI, M. 2008. Contribution of Anaerobically Mineralized Nitrogen to the Reliability of Planting or Presidedress Soil Nitrogen Test in Maize. *Agronomy Journal*. 100 (4): 1020–1025
- SCHERER-LORENZEN, M. 2008. Functional diversity affects decomposition processes in experimental grasslands. *Functional Ecology*. 22: 547–555
- SCHIPPER, L. A.; SPARLING, G. P. 2000. Performance of Soil Condition Indicators Across Taxonomic Groups and Land Uses. *Soil Science Society of America Journal*. 64: 300 - 311.

- SCHOLEFIELD, D.; FISHER, G.E.J. 2000. Nutrient cycling in grazing systems. En: Rooke, A.J.; Penning, P.D. eds. *Grazing Management: the principles and practice of grazing for profit and environmental gain within temperate grassland systems*. British Grassland Occasional Symposium No. 34. British Grassland Society, Reading. pp. 119–128
- SCHWERTL, M.; AUERSWALD, K.; SCHÄUFELE, R.; SCHNYDER, H. 2005. Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 109: 153–165.
- SIX, J.; GUGGENBERGER, G.; PAUSTIAN, K.; HAUMAIER, L.; ELLIOTT, E.T.; ZECH, W. 2001. Sources and composition of soil organic matter fractions between and within soil aggregates. *Eur. J. Soil Sci.* 52: 607–618.
- SMITH, B.N.; EPSTEIN, S. 1971. Two categories of C-13/C-12 ratios for higher plants. *Plant Physiol.* 47: 380–384.
- SORIANO, A. 1991. Río de la Plata grasslands. En: Coupland, RT. ed. *Natural grasslands: introduction and Western hemisphere*. Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 367-407.
- STANFORD, G.; EPSTEIN, E. 1974. Nitrogen mineralization-water relations in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 38: 103-106.
- SWIFT, M.J.; HEAL, O.W.; ANDERSON, J.M. 1979. *Decomposition in terrestrial Ecosystems*. University of California Press, Berkeley, EE.UU. 372 p.
- THOMAS, R.J. 1992. The role of the legume in the nitrogen cycle of productive and sustainable pastures. *Grass Forage Sci.* 47:133–142.
- VIDELA, C.; TRIVELIN, C.P. 2008. Influencia de la dispersión del suelo en la calidad de materia orgánica separada por fraccionamiento granulométrico. *Ciencia del Suelo*. 26 (1): 97 – 103.
- VIDELA, C.; PAZOS, A.; TRIVELIN, P.C.; ECHEVERRÍA, H.E.; STUDDERT, G.A. 2005. Mineralización bruta de nitrógeno bajo labranza convencional, siembra directa y pastura. *Ciencia del Suelo*. 23 (2): 1-12.
- WAGNER, G.H.; WOLF, D.C. 1999. Carbon transformations and soil organic matter formation. En: Sylvia, G.H.; Fuhrmann, J.J.; Hartel, P.G.; Fuhrmann, J.J. eds. *Principles and application of soil microbiology*. Prentice-Hall, New Jersey, EE.UU. 218 – 258.
- WANG, W.; SMITH, C. J.; CHALK, P. M.; CHEN, D. 2001. Evaluating Chemical and Physical Indices of Nitrogen Mineralization Capacity With an Unequivocal Reference. *Soil Science Society of America Journal*. 65: 368 - 376.
- WARING, S.A.; BREMNER, J.M. 1964. Ammonium Production in Soil Under Waterlogged Condition As an Index of Nitrogen Availability. *Nature*. 201: 951 - 952.
- WEDIN, D.A.; PASTOR, J. 1993. Nitrogen mineralization dynamics in grass monocultures. *Oecologia*. 96: 186–192.

- WEDIN, D.A.; TILMAN, D. 1990. Species effects on nitrogen cycling: A test with perennial grasses. *Oecologia*. 84: 433–441.
- WEDIN, D.A.; TILMAN, D. 1996. Influence of nitrogen loading and species composition on the carbon balance of grasslands. *Science*. 274: 1720-1723.
- WEST, J.B.; BOWEN, G.J.; CERLING, T.E.; EHLERINGER, J.R. 2006. Stable isotopes as one of nature's ecological recorders. *Trends in Ecology and Evolution*. 21(7): 408-414.
- WHITEHEAD, D.C. 1995. *Grassland Nitrogen*. CAB International, Wallingford. 397 pp.
- WHITEHEAD, D.C.; BRISTOW, A. 1990. Transformations of nitrogen following application of ¹⁵N labelled cattle urine to an established grass sward. *J. Appl. Ecol.* 27: 667-678.
- WILSON, J.R.; AKIN, D.E.; McLEOD, M.N.; MINSON, D.J. 1989. Particle size reduction of the leaves of a tropical and a temperate grass by cattle. II. Relation of anatomical structure to the process of leaf breakdown through chewing and digestion. *Grass and Forage Science*. 44: 65-75.