

## EFFECTO DE LA ROTACIÓN DE CULTIVOS EN SIEMBRA DIRECTA SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFATASA DEL SUELO

LUCIANO ANDRÉS GABBARINI<sup>1\*</sup>; JUAN PABLO FRENE<sup>1</sup> & LUIS GABRIEL WALL<sup>1</sup>

Recibido: 27-12-16

Recibido con revisiones: 31-03-17

Aceptado: 14-05-17

### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar las variaciones en la actividad enzimática de fosfatasa de suelos agrícolas, comparando el efecto del monocultivo de soja con la rotación de cultivos, utilizando suelos no cultivados de ambientes naturales como controles. Se determinaron y analizaron los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$ . Las muestras de suelo fueron tomadas en cuatro establecimientos productivos de diferentes localidades a lo largo de una transecta de 400 km (este-oeste) en la región núcleo de la Argentina. Los muestreos, cuatro en total, se realizaron en dos años sucesivos, tanto en verano como en invierno. La cantidad de enzima fosfomonoesterasa en el suelo, estimada como  $V_{max}$  muestra diferencias significativas entre las prácticas agrícolas. La actividad de fosfomonoesterasa mostró un comportamiento estacional opuesto para los suelos sin rotación de cultivos y no cultivados, mientras que en aquellos suelos agrícolas con rotación de cultivos el comportamiento fue más similar a la que presentaron los suelos sin agricultura que a los agrícolas sin rotación. Independientemente del sitio de muestreo y de los tratamientos, los valores de  $K_m$  no mostraron diferencias pero sí se encontró una clara respuesta estacional. Se encontró una correlación positiva entre la actividad fosfatasa y la biomasa microbiana, pero a partir de la estimación de una actividad específica se concluye que la biomasa microbiana no puede explicar en su totalidad las diferencias que se encontraron entre tratamientos. Esto sugiere un aporte significativo de actividad enzimática al suelo dado por los propios cultivos.

**Palabras clave.** Monocultivo, Biomasa microbiana, Enzimas.

### EFFECT OF NO-TILL CROP ROTATION ON SOIL PHOSPHATASE ACTIVITY

#### ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effects of different no-till agricultural managements related to crop rotation over soil phosphatase kinetics parameters,  $V_{max}$  and  $K_m$ , using grassland soils as references. Treatments were replicated sampling during summer and winter in four productive fields at different locations along a 400 km east-west transect in the central Argentinean Pampas, through successive cropping cycles within two years. The quantity of soil phosphatase estimated as  $V_{max}$  show significant differences between agricultural practices. Opposite seasonal dynamics of phosphatase activities were found between grassland soils and monocropping agricultural soils while crop rotated. Soils dynamics were more similar to grassland than to monocropping ones. Regardless of the location and treatment,  $K_m$  values did not show differences, but clearly show a seasonal response. A positive correlation was found between phosphatase activities and microbial biomass, but microbial biomass could not fully explain  $V_{max}$  values since an estimation of specific activity on the basis of microbial biomass still show the differences between treatments.

**Key words.** Monocropping, Microbial biomass, Enzymes.

1. Laboratorio de Biología de Suelos, Universidad Nacional de Quilmes

\* Autor de contacto: luciano.gabbarini@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La adopción de las tecnologías de siembra directa (SD) en los manejos de la agricultura conservacionista ha generado importantes ventajas ambientales y económicas (Virto *et al.*, 2012). El uso de la SD favorece la acumulación de carbono (C) orgánico y la preservación del agua en el suelo, reduciendo el riesgo de erosión hídrica y eólica, especialmente si al manejo de SD se le suma la rotación de cultivos (Derpsch *et al.*, 2010).

Los niveles de adopción de la SD son cercanos al 8% en el Mundo y cercano al 80% en la Argentina respecto al total de la superficie bajo agricultura (Derpsch & Friedrich, 2009; Albertengo *et al.*, 2013). La agricultura bajo SD en casos en los que su implementación no es acompañada por la rotación de cultivos pueden presentar un riesgo alto en la productividad y en el impacto ambiental debido a la disminución de la calidad de suelo (Pittelkow *et al.*, 2015). El impacto a largo plazo de la rotación de cultivos y las prácticas de fertilización en sistemas de labranza convencional sobre las propiedades físicas y químicas del suelo están bien documentados (Klose *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000; Ekenler & Tabatabai, 2002). Sin embargo, en los suelos bajo SD este tipo de caracterización ha sido menos estudiada.

Un trabajo reciente de escala regional muestra que el monocultivo de soja bajo SD reduce la diversidad beta bacteriana mientras que bajo rotación de cultivos este tipo de diversidad se mantiene en los mismos niveles que los suelos no agrícolas de ambientes naturales (Figuerola *et al.*, 2014). En otro trabajo, realizado sobre las mismas muestras de suelo, se observó que los perfiles de ácidos grasos permiten discriminar entre suelos bajo rotación de cultivos y monocultivos en SD (Ferrari *et al.*, 2015).

Las actividades enzimáticas del suelo han sido sugeridas como indicadores biológicos de la potencial funcionalidad del suelo debido a que son la expresión de la actividad biológica del suelo y están estrictamente relacionadas al ciclo de los nutrientes y las transformaciones químicas que ocurren en el suelo (DeForest, 2009; German *et al.*, 2011). Las enzimas responden rápidamente a cambios en el suelo causados por factores naturales o antropogénicos y sus actividades, como velocidades iniciales de una reacción, se pueden medir de forma sencilla y altamente reproducible (DeForest, 2009; German *et al.*, 2011). La actividad de la enzima fosfomonoesterasa (FME), clave en el ciclo del fósforo (P) ha sido muy estudiada en

el suelo (Deng & Tabatabai, 1997; Gianfreda *et al.*, 2005). La FME cataliza la hidrólisis de uniones ester-fosfato (Nannipieri *et al.*, 2012) y libera un fosfato que puede ser asimilado por plantas o microorganismos (Deng & Tabatabai, 1997). Se ha mostrado que la actividad de FME, de igual modo que otras hidrolasas, dependen de numerosos factores tales como las propiedades químicas y físicas del suelo, la presencia o ausencia de organismos en el suelo, el tipo de cobertura vegetal y la presencia de inhibidores o activadores (Nannipieri *et al.*, 2011; Burns *et al.*, 2013).

En general las actividades enzimáticas del suelo están relacionadas directamente a la cantidad de biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) presente en el suelo (Ekenler & Tabatabai, 2002; Wang *et al.*, 2015) a pesar de que el origen no solo corresponde a los microorganismos, sino que también son aportadas por los exudados de las raíces vegetales y la fauna presente en el suelo (Louche *et al.*, 2010; Nannipieri *et al.*, 2011). En el suelo, cuando se pretende evaluar la respuesta a un factor de disturbio o estrés, la medida de la biomasa microbiana tiene una ventaja por sobre el contenido de materia orgánica total, pues la primera tiene un tiempo de recambio de menos de un año mientras que la materia orgánica total requiere cerca de una década para que el cambio sea apreciable (Laudicina *et al.*, 2012). Cuando se utiliza a la biomasa microbiana como un indicador biológico de calidad de suelo es relevante considerar la variabilidad estacional, debido a la variación de la temperatura del suelo, la humedad y el aporte de compuestos orgánicos e inorgánicos (Feng & Simpson, 2009; Ge *et al.*, 2010).

Numerosos indicadores de calidad basados en las propiedades químicas, físicas y biológicas de suelo (Carter, 2002; Romaniuk *et al.*, 2014) se han puesto a prueba en mayor medida para evaluar la sustentabilidad de los manejos agrícolas bajo el sistema de labranza convencional (Romaniuk *et al.*, 2011b).

El objetivo de este trabajo fue determinar y evaluar los parámetros cinéticos de la FME,  $K_m$  y  $V_{max}$  y su relación con la biomasa microbiana en manejos agrícolas contrastantes bajo siembra directa, en la región núcleo de la Argentina.

La hipótesis del trabajo es que tanto la actividad FME como la biomasa microbiana pueden ser sensibles para diferenciar manejos agrícolas bajo siembra directa en situación de rotación de cultivos y en monocultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Definición de los tratamientos

Se seleccionaron dos manejos agrícolas como tratamientos contrastantes de acuerdo al encuadramiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) establecida por los principios de agricultura certificada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2007) y la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (AAPRESID, 2014).

El tratamiento Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) hace referencia a un manejo agrícola sustentable bajo SD con rotación de cultivos (trigo-soja maíz-soja), que incluye también vicia como cultivo de cobertura en invierno. En contraposición a las BPA, las Pobres Prácticas Agrícolas (PPA) hacen referencia a un manejo no sustentable bajo SD directa y tendencia al monocultivo de soja (FAO, 2007; AAPRESID, 2014). Asimismo, el Ambiente Natural (AN) es definido como un área de al menos una hectárea con pastos naturales cercano (menos de 5 km) a los lotes cultivados donde no se ha realizado agricultura por lo menos en los últimos 30 años (Wall, 2011; Figuerola *et al.*, 2012).

Los suelos agrícolas se eligieron fijando como criterio una historia mínima de 15 años con manejos en SD. Las diferencias entre BPA y PPA están dadas por el régimen de las rotaciones de los últimos cinco años, siendo que los lotes con BPA tienen en promedio 62% más de maíz y cultivos de invierno que los lotes de PPA. El índice de rotación de cultivos, calculado como el número de cultivos por año fue siempre más alto en BPA que en PPA para todos los sitios con valores promedio de 1,58 y 1,17, respectivamente.

### Sitios de muestreo

Se realizaron 4 réplicas de los tratamientos tomando muestras de situaciones equivalentes en 4 localidades de la Pampa Central Argentina, cubriendo una distancia de 400 km de este a oeste. Los sitios de réplica de los muestreos se encuentran en

Bengolea (33°01'31"S;63°37'53"O) y Monte Buey (32° 58' 14"S; 62° 27'06"O) en la provincia de Córdoba; Pergamino (33° 56'36"S; 60°33' 57"O) en la provincia de Buenos Aires, y Viale, (31°52'59"S; 59°40'07"O) en la provincia de Entre Ríos. Las precipitaciones anuales se incrementan de oeste a este (795 mm a 1023 mm, Servicio Meteorológico Nacional, registrado a noviembre de 2012) y la temperatura media anual también aumenta en el mismo sentido cardinal (16,3 °C a 18 °C, Servicio Meteorológico Nacional, registrado a Noviembre de 2012). Las precipitaciones varían estacionalmente y se concentran fundamentalmente en primavera y verano (Tabla 1). En los suelos de los diferentes sitios se observa una variación en la cantidad y calidad de sus arcillas (Rosa *et al.*, 2014) evidenciándose un aumento en las arcillas y una disminución en el contenido de arena de oeste (Bengolea) a este (Viale) (Castiglioni *et al.*, 2013). En Bengolea el suelo es Entic Haplustol franco arenoso, en Monte Buey es Argiudol Típico franco limoso con un moderado horizonte *Bt* iluvial y una proporción alta de limo, en Pergamino es un Argiudol Típico franco limoso con horizonte *Bt* bien desarrollado, y en Viale es Hapludert franco limo-arcilloso (Castiglioni *et al.*, 2013; Duval *et al.*, 2013). Mayor detalle de las diferentes prácticas agrícolas y los ambientes en los distintos sitios pueden encontrarse en los trabajos de Duval *et al.* (2013) y Figuerola *et al.* (2012).

En cada tratamiento y en cada sitio se llevó a cabo un muestreo de suelo en verano (febrero) e invierno (septiembre) de 2010 y 2011. En cada muestreo se tomaron tres submuestras por cada tratamiento a una distancia mínima de 50 m una de otra. Cada submuestra estuvo compuesta por 16-20 piques de los 10 cm superficiales de suelo mineral tomados de manera aleatoria en una superficie de 5 m<sup>2</sup> evitando la línea de siembra, que se homogenizaron en el lugar del muestreo para formar la submuestra. Las submuestras de suelo se transportaron y almacenaron a 4 °C. Dentro de los tres días después de haber sido colectadas, las muestras de suelo fueron tamizadas en una malla de 2 mm y finalmente se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento (no más de 2 meses).

Tabla 1. Precipitaciones y humedad del suelo. Los valores entre paréntesis corresponden a las precipitaciones mínimas y máximas.

Table 1. Precipitations and soil humidity. Values in parentheses are the minimum and maximum precipitations.

	Verano 2010			Invierno 2010			Verano 2011			Invierno 2011		
	AN	BPA	PPA	AN	BPA	PPA	AN	BPA	PPA	AN	BPA	PPA
Humedad %	25,8	21,3	20,2	22,7	16,6	12,2	14,6	17,8	9,6	16,7	15,2	13,3
Precipitaciones mm	492,8 (89-831)			38,5 (16-51)			341,9 (245-517)			43,85 (14-77)		

AN: ambiente natural; BPA: buenas prácticas agrícolas; PPA: pobres prácticas agrícolas.

AN: natural environmental; BPA: good agriculture practices; PPA: poor agriculture practices.

### Actividad FME del suelo

De cada submuestra, 0,1 g de suelo fue agregado a un tubo de 20 mL (BMT-20 S, IKA, Germany) junto con 10 esferas de acero de 5 mm de diámetro y luego resuspendido en 10 mL de buffer MES (ácido 2-morfolino etano sulfónico) (Sigma-Aldrich Co. Ltd) estéril 0,1M y pH 6,1. La suspensión se homogenizó en un homogeneizador ULTRA TURRAX® Tube Drive (IKA, Germany) durante dos minutos a 6000 rpm y temperatura ambiente. La suspensión de suelo generada fue inmediatamente utilizada para medir las cinéticas enzimáticas utilizando 200 µL de suspensión de suelo y 80 µL de sustrato MUB-Fosfato (4-metil umbeliferona-fosfato) por pocillo en una placa de 96 pocillos. En cada placa se realizaron por triplicado las mezclas de reacción de la muestra para cada una de las concentraciones de sustrato. Además en todas las placas se realizó un control de sustrato (sustrato + buffer), un control de muestra (muestra + buffer) y una corrección del *quenching* (muestra + MUB) que sirve para medir el grado de intensidad de la fluorescencia del fluoróforo MUB (4-metil umbeliferona) que se pierde por la turbidez propia del suelo y los compuestos fenólicos que contiene (Marx *et al.*, 2001). El volumen final de cada pocillo fue de 280 µL. La fluorescencia de los controles se restó al valor de las muestras. Como estándar se utilizó MUB en concentraciones finales de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 pmol por pocillo. El sustrato MUB-fosfato (Sigma-Aldrich Co. Ltd.) se disolvió en agua estéril y las concentraciones finales en los pocillos fueron 1, 2, 8, 20, 50, 60, 80 y 90 mM. La intensidad de la fluorescencia se leyó con una intensidad de 355 nm de longitud de onda y una emisión de 460 nm de longitud de onda en el lector de fluorescencia para placas (POLARstar Omega, BMG LABTECH). El lector de placas fue programado para realizar 40 ciclos de lectura de 60 seg a 30 °C.

La velocidad inicial ( $V_o$ ) de la reacción se calculó como la cantidad de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo y se expresó en nmoles de 4-MUB producidos por minuto y por gramo de suelo seco. Los parámetros cinéticos,  $V_{max}$  y  $K_m$ , se estimaron ajustando los datos experimentales a la ecuación de la hipérbola cuadrática  $V_o = (V_{max}S)/(K_m + S)$  mediante el uso del programa RStudio (RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA).

### Biomasa microbiana

Para esta determinación las muestras fueron previamente secadas por exposición al aire en un cuarto ventilado con temperatura controlada a 25 °C durante 72 hs. De cada muestra y por cuadruplicado se colocaron 7,5 g en tubos cónicos de 50 mL, se agregaron 2,5 mL de agua destilada y se incubaron por 15 h a 30 °C en oscuridad. Luego de esta incubación, dos de los tubos se fumigaron con 0,4 mL de cloroformo puro (Carlo Erba) libre de etanol durante 30 min. Los dos tubos restantes, sin tratamiento con cloroformo, fueron utilizados como con-

trol. El contenido de los cuatro tubos se extrajo inmediatamente con 30 mL de sulfato de potasio 0,5 M durante 1 h en agitación a 200 rpm. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 800 g (Thermo Electro Corporation, rotor R 8947) y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro FP0859 (Hahnemühle, German) (Vance *et al.*, 1987).

El carbono de la biomasa microbiana fue estimado por oxidación con dicromato (Brookes & Joergensen, 2006). Los resultados se expresaron como el valor promedio respecto a la curva patrón realizada con glucosa (0,015-0,075 mg.mL<sup>-1</sup>). La biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) se expresó como microgramos de carbono oxidable por gramo de suelo seco calculado como la diferencia entre los valores de los tubos fumigados y no fumigados (Brookes & Joergensen, 2006).

### Datos complementarios

Se utilizan los valores de carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (Nt), fósforo extraíble (Pe), pH y humedad del suelo que fueron tomados de Duval *et al.* (2013). Las determinaciones fueron realizadas a partir de las mismas muestras de suelo.

### Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados utilizando modelos lineales generalizados mixtos y análisis multivariados del tipo de componentes principales (Di Rienzo *et al.*, 2012). Las comparaciones se hicieron utilizando el test LSD Fisher. Las correlaciones entre variables se hicieron utilizando el test de Pearson ( $\alpha=0,05$ ).

Los resultados mostrados en tablas y figuras fueron analizados de las siguientes formas: a) con los tratamientos como criterio de clasificación y estación del año y año de muestreo como variable aleatoria (n=48), b) con la estación del año como criterio de clasificación y el año como variable aleatoria (n=24), y c) con el año como criterio de clasificación y la estación del año como variable aleatoria (n=24).

## RESULTADOS

### Actividad enzimática y caracterización de $V_{max}$ y $K_m$

Las  $V_o$  de FME estimadas para cada suspensión de suelo y con diferentes concentraciones de sustrato se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten ( $r^2 > 0,91$ ) permitiendo la estimación de  $V_{max}$  y  $K_m$  aparentes. Los valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  no mostraron interacción entre sitios y tratamientos al ser analizados utilizando modelos lineales generalizados y mixtos.

Los valores de FME en suelo estimada como el valor de  $V_{max}$  muestran diferencias significativas (p valor < 0,05)

entre tratamientos en siembra directa con BPA y aquel con tendencia al monocultivo (PPA). Además, los valores de  $V_{max}$  mostraron diferente comportamiento estacional dependiendo del tratamiento. Los suelos de PPA muestran un comportamiento estacional opuesto a los suelos de AN (Fig 1). Mientras en los AN los valores de actividad FME disminuyen de verano a invierno, en los suelos bajo PPA estos valores aumentan. Entre estas dos dinámicas estacionales se encuentran los resultados de BPA que no mostraron diferencias para  $V_{max}$  entre las diferentes estaciones en las que se realizó muestreo (Fig 1, Tabla 2). Las diferencias entre los valores de  $V_{max}$  de las muestras tomadas en suelos bajo BPA y PPA son significativas tanto en verano como en invierno (Tabla 2).

Al considerar réplicas a los cuatro muestreos y variables aleatorias a los sitios, las estaciones y el año de muestreo, se encontró que los valores de  $V_{max}$  son significativamente diferentes siendo AN > BPA > PPA (Tabla 3).

Los valores de  $K_m$  fueron muy similares y no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos bajo estudio (Fig 2 y Tabla 2). Sin embargo los valores de  $K_m$  mostraron un claro efecto estacional con valores para verano significativamente mayores ( $p$  valor < 0,001) que para invierno (Fig 2) con valores promedio de 44,0 y 16,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

La relación  $V_{max}/K_m$  se utiliza para caracterizar la actividad catalítica de una enzimática determinada (Das *et al.*, 1997). En éste caso, los valores no se vieron afectados por la rotación de cultivos, BPA y PPA no mostraron diferencia

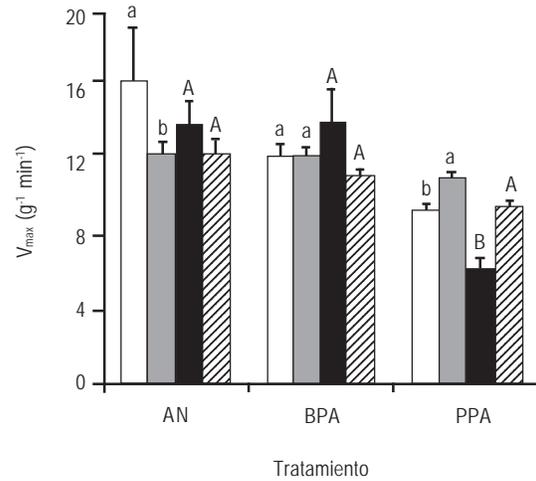


Figura 1. Dinámica de la actividad fosfomonoesterasa (FME).  $V_{max}$  de las muestras tomadas en verano (blanco) e invierno (gris) de los años 2010 (sin líneas) y 2011 (con líneas). Cada barra es la media  $\pm$  DE calculados a partir de las tres muestras tomadas en los cuatro sitios: Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale ( $n=12$  para cada tratamiento). Los tratamientos son ambiente natural (AN), buenas prácticas agrícolas (BPA) y pobres prácticas agrícolas (PPA). Igual letra por encima de las barras denota que no existe diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre las muestras de verano e invierno para cada tratamiento en 2010 (minúsculas) y 2011 (mayúsculas).  
 Figure 1. Dynamic of phosphomonoesterase (PME) activity.  $V_{max}$  of summer (white) and winter (grey) samples taken in 2010 (without stripes) and 2011 (stripes). Each bar is the mean  $\pm$  SD for three samples in four sites: Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale ( $n=12$  in each treatment). The treatments are natural environmental (AN), good agriculture practices (BPA) and poor agriculture practices (PPA). Different letters indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) in each treatment for 2010 (lower case) and 2011 (capital letter).

Tabla 2. Parámetros cinéticos ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) para FME y biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) en verano e invierno. Todos los valores son expresados por gramo de suelo seco y son promedios de cuatro réplicas (Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale) para 2010 y 2011. Los valores con idéntica letra en superíndice no se diferencian significativamente ( $\alpha < 0,05$ ). Los valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar ( $n=24$ ).

Table 2. Kinetic parameters ( $V_{max}$  and  $K_m$ ) of phosphomonoesterase and microbial biomass ( $C_{mic}$ ) in summer and winter seasons. Values, expressed in g of dry soil, are mean of four replicates (Bengolea, Monte Buey, Pergamino and Viale) for 2010 and 2011. The values in brackets are the standard deviation ( $n=24$ ). Different superscript letters indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ).

	Verano			Invierno		
	AN	BPA	PPA	AN	BPA	PPA
$V_{max}$ (nmol g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	17,7 (3,1) <sup>a</sup>	13,0 (1,4) <sup>b</sup>	7,7(0,7) <sup>a</sup>	12,4 (0,5) <sup>bc</sup>	12,1 (0,5) <sup>c</sup>	9,9 (0,3) <sup>d</sup>
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	49,0 (6,1) <sup>a</sup>	45,7 (7,9) <sup>a</sup>	37,3 (6,3) <sup>a</sup>	17,3 (3,3) <sup>b</sup>	16,7 (2,4) <sup>b</sup>	14,5 (2,2) <sup>b</sup>
$V_{max}/K_m$ (nmol g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> $\mu\text{M}^{-1}$ )	0,47 (0,06) <sup>a</sup>	0,40 (0,04) <sup>ab</sup>	0,29 (0,03) <sup>b</sup>	1,79 (0,54) <sup>a</sup>	0,95 (0,09) <sup>a</sup>	1,07 (0,14) <sup>a</sup>
$C_{mic}$ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	442 (32) <sup>ab</sup>	414 (34) <sup>ab</sup>	360 (30) <sup>b</sup>	487 (30) <sup>a</sup>	441 (32) <sup>ab</sup>	384 (28) <sup>ab</sup>

AN: ambiente natural; BPA: buenas prácticas agrícolas; PPA: pobres prácticas agrícolas.  
 AN: natural environmental; BPA: good agriculture practices; PPA: poor agriculture practices.

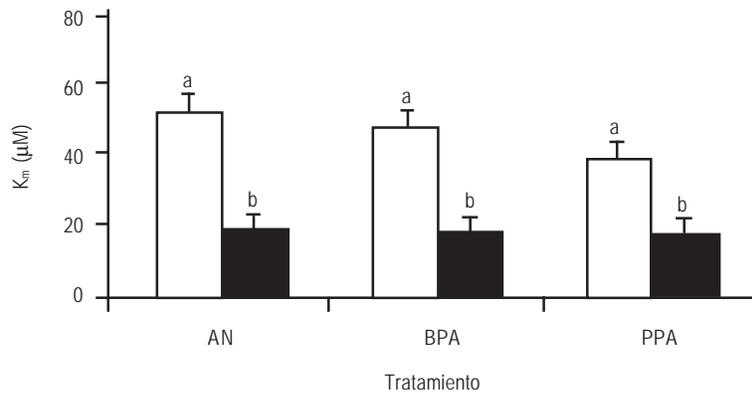


Figura 2. Efecto estacional sobre el  $K_m$  de fosfomonoesterasa (FME). Cada barra es la media  $\pm$  DE calculados a partir de los muestreos de verano (blanco) e invierno (negro) de tres muestras tomadas en los cuatro sitios: Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale en los años 2010 y 2011 ( $n=24$  para cada tratamiento). Los tratamientos son ambiente natural (AN), buenas prácticas agrícolas (BPA) y pobres prácticas agrícolas (PPA). Igual letra por encima de las barras denota que no existe diferencia entre las muestras ( $\alpha < 0,05$ ).

Figure 2. Seasonal effect over  $K_m$  of phosphomonoesterase (PME). Each bar is the mean  $\pm$  SD for three samples in four sites: Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale ( $n=24$  in each treatment) for summer (white) and winter (black). The treatments are natural environmental (AN), good agriculture practices (BPA) and poor agriculture practices (PPA). Different letters indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ).

significativa. Sin embargo, mostraron valores para los tratamientos bajo SD (BPA y PPA) estadísticamente más pequeños que para AN (Tabla 3) cuando se tomaron en cuenta los valores en promedio para los dos años evaluados.

### Biomasa microbiana

La biomasa microbiana fue mínimamente afectada por la rotación de cultivos. No obstante, la biomasa microbiana en el tratamiento bajo PPA fue menor a los otros tratamien-

tos pero no alcanzan a ser significativamente diferentes en ninguno de los muestreos realizados (Tabla 2). En cambio, cuando el test comparativo se realizó tomando a la estación y al año de muestreo como variables aleatorias los tratamientos AN y PPA fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 3). El tratamiento bajo BPA que presenta un valor de biomasa microbiana intermedio entre AN y PPA no se diferenció estadísticamente de ninguno de ellos (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cinéticos ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) para fosfomonoesterasa (FME) y biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ). Todos los valores son expresados por gramo de suelo seco y son promedios de cuatro réplicas (Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale) para verano e invierno de 2010 y 2011. Los valores con idéntica letra en superíndice no se diferencian significativamente ( $\alpha < 0,05$ ). Los valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar ( $n=48$ ).

Table 3. Kinetics parameters ( $V_{max}$  and  $K_m$ ) of phosphomonoesterase and microbial biomass ( $C_{mic}$ ). Values, expressed in g of dry soil, are mean of four replicates (Bengolea, Monte Buey, Pergamino and Viale) at summer and winter of 2010 and 2011. The values in brackets are the standard deviation ( $n=48$ ). Different superscript letters indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ).

	AN	BPA	PPA
$V_{max}$ (nmol $g^{-1} min^{-1}$ )	15,0 (1,1) <sup>a</sup>	12,5 (0,74) <sup>b</sup>	8,8 (0,42) <sup>c</sup>
$K_m$ (µM)	33,1 (4,1) <sup>a</sup>	31,2 (4,6) <sup>a</sup>	26,0 (3,7) <sup>a</sup>
$V_{max}/K_m$ (nmol $g^{-1} min^{-1} \mu M^{-1}$ )	1,13 (0,29) <sup>a</sup>	0,68 (0,06) <sup>b</sup>	0,68 (0,09) <sup>b</sup>
$C_{mic}$ (µg $g^{-1}$ )	465 (22) <sup>a</sup>	428 (23) <sup>ab</sup>	372 (20) <sup>b</sup>

AN: ambiente natural; BPA: buenas prácticas agrícolas; PPA: pobres prácticas agrícolas.

AN: natural environmental; BPA: good agriculture practices; PPA: poor agriculture practices.

### Relación $V_{max}/C_{mic}$

La relación  $V_{max}/C_{mic}$  referida como la eficiencia enzimática por otros autores (Allison *et al.*, 2007) se utilizó como una manera de estimar la actividad específica de los suelos (unidades de actividad por gramo de  $C_{mic}$ ). En las muestras de verano, ésta relación mostró la tendencia AN>BPA>PPA con diferencia significativa ( $p$  valor<0,05) entre BPA y PPA. Mientras tanto, las muestras tomadas en invierno presentaron valores más pequeños y sin una tendencia entre los tratamientos (Fig 3).

### Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis multivariado de la base de datos considerando  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $C_{mic}$ , sumado a otro conjunto de variables como humedad, pH, fósforo extraíble (Pe), carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (Nt) que fueron determinadas a partir de las mismas muestras de suelo por Duval y *et al.* (2013). El eje PC1 (explica el 64,2% de la varianza) muestra una clara separación entre los diferentes tratamientos, separándolos en tres grupos independientemente de la estación en la que se tomó la muestra (Fig 4).

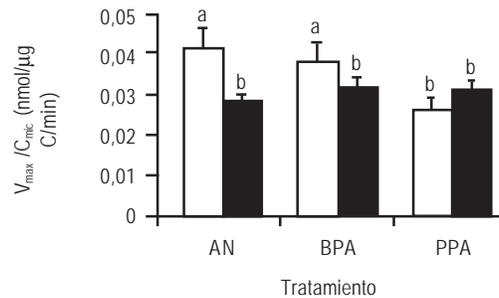


Figura 3. Efecto estacional sobre la actividad específica  $V_{max}/C_{mic}$ . Cada barra es la media  $\pm$  DE calculados a partir de los muestreos de verano (blanco) e invierno (negro) de tres muestras tomadas en los cuatro sitios: Bengolea, Monte Buey, Pergamino y Viale en los años 2010 y 2011 ( $n=24$  para cada tratamiento). Los tratamientos son ambiente natural (AN), buenas prácticas agrícolas (BPA) y pobres prácticas agrícolas (PPA). Igual letra por encima de las barras denota que no existe diferencia entre las muestras ( $\alpha < 0,05$ ).

Figure 3. Seasonal effect over specific activity  $V_{max}/C_{mic}$ . Each bar is the mean  $\pm$  SD for 3 samples in four sites: Bengolea, Monte Buey, Pergamino and Viale ( $n=24$  in each treatment) for summer (white) and winter (black) of 2010 and 2011. The treatments are natural environmental (AN), good agriculture practices (BPA) and poor agriculture practices (PPA). Different letters indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ).

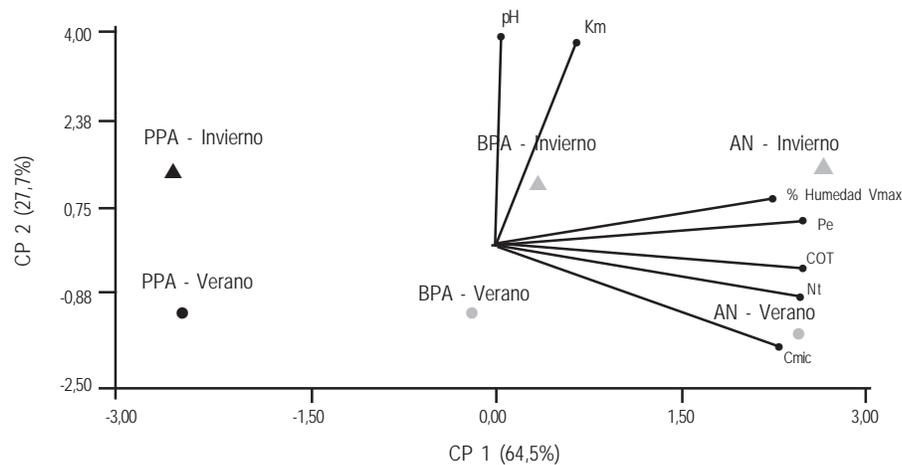


Figura 4. Análisis de componentes principales incluyendo a las variables  $V_{max}$  y  $K_m$  de la FME,  $C_{mic}$ , carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (Nt), fósforo extraíble (Pe), pH y humedad. Los tratamientos son ambiente natural (AN), buenas prácticas agrícolas (BPA) y pobres prácticas agrícolas (PPA). Las líneas indican el sentido y la magnitud de la variable. Los valores de COT, Nt, Pe, pH y humedad fueron tomados de Duval *et al.* (2013).

Figure 4. Principal component analysis including  $V_{max}$  and  $K_m$  of phosphomonoesterase,  $C_{mic}$ , total organic carbon (COT), total nitrogen (Nt), phosphorus extractable (Pe), pH and humidity. Lines indicate the direction and magnitude of the parameter. Circles (summer) and triangles (winter) are color-coded to indicate the different managements: white corresponds to natural environments (AN), grey to good agricultural practices (BPA); black are Poor agricultural practices (PPA). The values of COT, Nt, Pe, pH and humidity were taken from Duval *et al.* (2013).

## DISCUSIÓN

La posibilidad de replicar los muestreos en diferentes estaciones de dos años consecutivos nos permitió encontrar que la dinámica de la actividad de la FME es afectada por la rotación de cultivos. Además, éstas medidas bajo diferentes situaciones fueron opuestas entre los tratamientos con tendencia al monocultivo (PPA) y los de ambientes naturales (AN). Por su parte, los suelos bajo un tratamiento con BPA mostraron un comportamiento intermedio con mayor similitud a los AN.

En los suelos de bosques las dinámicas de la actividad de la FME se han explicado sobre la base de una diferencia en la humedad del suelo en las diferentes estaciones (Grierson & Adams, 2000). En nuestro caso de estudio la variación en la humedad de los suelos al momento de los muestreos (Tabla 1) no muestra ninguna relación con las variaciones encontradas en  $V_{max}$  (Fig 1 y Tabla 2). Las diferencias en las dinámicas estacionales que se encontró sugieren que la explicación puede deberse a la diferencia de intensidad en las rotaciones de cultivos en BPA respecto a PPA. Ésta explicación se basa en que al aumentar el número de especies que ocupan el suelo durante un tiempo determinado se ubica al tratamiento BPA en una situación intermedia entre el AN, que se encuentra siempre con varias especies vegetales activas, y el tratamiento PPA, que presenta mayormente la misma especie.

Al igual que Wang *et al.* (2015) se encontró una correlación positiva entre la actividad FME y  $C_{mic}$  ( $p$  valor  $<0,02$ ). En nuestro trabajo los valores de  $C_{mic}$  no alcanzan para explicar los valores de  $V_{max}$  debido a que la estimación de actividad específica ( $V_{max}/C_{mic}$ ) no arroja un valor constante. En otras palabras, al seguir observando diferencias entre los tratamientos se sugiere que hay aportes de FME que no están compensados por el  $C_{mic}$ . Considerando que existe una contribución mayormente bacteriana a la actividad de la FME y teniendo en cuenta que se ha mostrado (a partir de las mismas muestras que utilizamos aquí) que los lotes con tendencia al monocultivo de soja presentan una menor diversidad bacteriana tipo beta por pérdida de especies endémicas (Figuerola *et al.*, 2014), podría especularse que estas especies bacterianas que desaparecen son responsables de las diferencias en la actividad de la FME. Una alternativa es que una proporción de la FME sea aportada por los exudados radiculares, algo que ya se ha observado con anterioridad (Nannipieri *et al.*, 2011).

Los valores de  $K_m$  no se afectaron por los manejos agrícolas pero claramente mostraron un efecto estacional.

La constante  $K_m$  se considera, por aproximación, un potencial de afinidad de las FME del suelo por el sustrato utilizado en el ensayo (MUB-fosfato), y ésta afinidad aumenta cuando  $K_m$  disminuye. Estos resultados pueden atribuirse a: 1) las diferentes FME expresadas (isoenzimas) en diferentes condiciones de humedad, temperatura y pH determinados por los cambios estacionales, pues en el análisis de componentes principales las variables pH y  $K_m$  de las FME se manifestaron en el eje PC2 (explica el 27,7% de la varianza) (Fig 4), 2) la presencia de un inhibidor competitivo en verano para FME, como podría llegar a ser el fosfato utilizado como fertilizante que se adicionó al suelo en primavera con la siembra. Sin embargo, la variación en los valores de  $K_m$  también se observó en los ambientes naturales (AN) sin fertilización fosforada alguna, con lo cual la hipótesis del inhibidor competitivo pierde peso para explicar el fenómeno estacional.

A partir del resultado del análisis de componentes principales donde se asocian las variables con vectores se observa que  $V_{max}$  y  $C_{mic}$  junto a otras variables como  $Nt$ ,  $COT$ ,  $Pey$  humedad del suelo permiten diferenciar los tratamientos respecto al nivel de rotación de cultivos en suelos bajo siembra directa.

## CONCLUSIONES

La actividad de FME en suelos bajo SD medidos como  $V_{max}$  permite diferenciar suelos con prácticas de manejo sustentables con rotación de cultivos de suelos con prácticas no sustentables manejados con monocultivo. Esta diferencia es independiente del efecto estacional que se observa en la FME de los suelos expresado en el cambio de la  $K_m$  para la FME según la estación del año. Las variaciones en la actividad no pueden explicarse por el valor de  $C_{mic}$  sugiriendo un aporte de los cultivos a esta actividad fisiológica del suelo, lo que se podría evaluar, a futuro, en situaciones con intensificación de la cantidad de cultivos por rotación.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los miembros del consorcio BIOSPAS por su participación en los muestreos.

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Argentina (ANPCYT PAE 36976 y PID53) y la Universidad Nacional de Quilmes (PUNQ R732/11). LA Gabbarini y LG Wall son investigadores de CONICET y JP Frene cuenta con beca Doctoral CONICET.

## BIBLIOGRAFÍA

- AAPRESID 2014. Agricultura Certificada. <http://www.aapresid.org.ar/ac/>. 11/10/2016.
- Albertengo, J; C Belloso; MB Giraud; R Peiretti; H Permingeat & L Wall. 2013. 15 Conservation Agriculture in Argentina. *Conserv. Agric. Glob. Prospects Chall.* 352 pp.
- Allison, B; L Condon; D Peltzer; S Richardson & B Turner. 2007. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1770-1781.
- Brookes, P & R Joergensen. 2006. Microbial Biomass Measurements by Fumigation Extraction. In: Bloem J., Hopkins D., & Benedetti A. (eds), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, CABI publishing, Cambridge.
- Burns, RG; JL DeForest; J Marxsen; RL Sinsabaugh ; ME Stromberger; MD Wallenstein; MN Weintraub & A Zoppini. 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58: 216-234.
- Carter, MR. 2002. Soil Quality for Sustainable Land Management: Organic Matter and Aggregation Interactions that Maintain Soil Functions. *Agron. J.* 94: 38-47.
- Castiglioni, MG; F Behrends Kraemer; M Morras & H José. 2013. Efecto de la secuencia de cultivos bajo siembra directa sobre la calidad de algunos suelos de la región Pampeana. *Cienc. Suelo* 31: 93-105.
- Das, N; S Sengupta & M Mukherjee M 1997. Importance of Laccase in Vegetative Growth of *Pleurotus úorida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4120-4122.
- DeForest, JL. 2009. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1180-1186.
- Deng, S & M Tabatabai. 1997. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. Phosphatases and arylsulfatase. *Biol Fertil Soils.* 24: 141-146.
- Derpsch, R & T Friedrich. 2009. Global overview of Conservation Agriculture No-till adoption. 4th World Congress on Conservation Agriculture,
- Derpsch, R; T Friedrich; A Kassam & H Li. 2010. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *Int J Agric Biol Eng.* 3. .
- Dí Rienzo, JA; F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo. 2012. InfoStat versión 2012. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina., Córdoba.
- Duval, M; J Galantini; J Iglesias; S Caneloa; M Martineza & L Wall. 2013. Analysis of organic fractions as indicators of soil quality under natural and cultivated systems. *Soil Tillage Res.* 131: 11-19.
- Ekenler, M & M Tabatabai. 2002. b-Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biol. Fertil. Soils* 36: 367-376.
- FAO. 2007. Buenas Prácticas Agrícolas. [http://www.fao.org/prods/gap/home/principles\\_es.htm](http://www.fao.org/prods/gap/home/principles_es.htm). 11/10/2016.
- Feng, X & M Simpson. 2009. Temperature and substrate controls on microbial phospholipid fatty acid composition during incubation of grassland soils contrasting in organic matter quality. *Soil Biol Biochem.* 41: 804-812.
- Ferrari, AE; S Ravnskov; J Larsen; T Tønnersen; RA Maronna & L Wall. 2015. Crop rotation and seasonal effects on fatty acid profiles of neutral and phospholipids extracted from no-till agricultural soils. *Soil Use Manag.* 31(1):165-175.
- Figuerola, E; L Guerrero; D Türkowsky; L Wall & L Erijman. 2014. Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale. *Environ. Microbiol.* 17(3): 678-688.
- Figuerola, E; L Guerrero; S Rosa; L Simonetti L; M Duval; J Galantini; JC Bedano; L Wall & L Erijman. 2012. Bacterial Indicator of Agricultural Management for Soil under No-Till Crop Production. *PLoS ONE* 7: e51075.
- Ge, G; Z Li; F Fan; G Chu; Z Hou & Y Liang. 2010. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant Soil* 326: 31-44.
- German, DP; MN Weintraub; AS Grandy; CL Lauber; ZL Rinkes & SD Allison. 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biol. Biochem.* 43: 7e1397.
- Gianfreda, L; M Raa; A Piotrowskaa; G Palumbob & C Colombo. 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Sci. Total Environ.* 341: 265-279.
- Grierson, PF & MA Adams. 2000. Plant species affect acid phosphatase, ergosterol and microbial P in a Jarrah (*Eucalyptus marginata* Donn ex Sm.) forest in south-western Australia. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1817-1827.
- Klose, S; J Moore & M Tabatabai. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils* 29: 46-54.
- Laudicina, V; P Dennis; E Palazzolo & L Badalucco. 2012. Chapter 6: Key Biochemical Attributes to Assess Soil Ecosystem Sustainability. pp. 193-227. In: Malik A. & Grohmann E. (eds), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability*, Springer Science+Business Media.
- Louche, J; MA Ali; B Cloutier-Hurteau; F Sauvage; H Quiquampoix & C Plassard. 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 323-335.
- Marx, M; M Wood & S Jarvis. 2001. A microplate fluorometric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1633-1640.
- Moore, J; S Klose & M Tabatabai. 2000. Soil microbial biomass carbon and nitrogen as affected by cropping systems. *Biol Fertil Soils* 31: 200-210.
- Nannipieri, P; L Giagnoni; L Landi & G Renella. 2011. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. pp. 215-243. In: Bünemann E.K., Oberson A., & Frossard E. (eds), *Phosphorus in Action*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin.
- Nannipieri, P; L Giagnoni; G Renella; E Puglisi; B Ceccanti; G Masciandaro; F Fornasier; MC Moscatelli & S Marinari. 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils* 48: 743-762.
- Pittelkow, CM; X Liang; BA Linquist; KJ Van Groenigen; J Lee J; ME Lundy; N van Gestel N; J Six; RT Venterea & C van Kessel. 2015. Productivity limits and potentials of the principles of conservation agriculture. *Nature* 517: 365-368.

- Romaniuk, R; L Giuffre; A Costantini; N Bartoloni & P Nannipieri. 2011a. A comparison of indexing methods to evaluate quality of soils microbiological properties. *Soil Res.* 49: 733-741.
- Romaniuk, R; L Giuffré; A Costantini A; N Bartoloni & P Nannipieri. 2014. A comparison of indexing methods to evaluate quality of horticultural soils. Part II. Sensitivity of soils microbiological indicators. *Soil Res.* 52: 409-418.
- Romaniuk, R; L Giuffre L; A Costantini & P Nannipieri. 2011b. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. *Ecol. Indic.* 11: 1345-1353.
- Vance, ED; PC Brookes & DS Jenkinson. 1987. Microbial biomass measurements in forest soils: Determination of kC values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biol. Biochem.* 19: 689-696.
- Virto, I; P Barré; A Burlot & C Chenu. 2012. Carbon input differences as the main factor explaining the variability in soil organic C storage in no-tilled compared to inversion tilled agrosystems. *Biogeochemistry* 108: 17-26.
- Wall, L. 2011. The BIOSPAS consortium: Soil Biology and Agricultural Production. pp. 299-306. *In: de Bruijn F. (eds), Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, John Wiley & Sons, Inc,
- Wang, R; M Dorodnikov; S Yang; Y Zhang; TR Filley; RF Turco; Y Zhang; Z Xu; H Li & Y Jjiang. 2015. Responses of enzymatic activities within soil aggregates to 9-year nitrogen and water addition in a semi-arid grassland. *Soil Biol. Biochem.* 81: 159-167.