

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y SU RELACIÓN  
CON EL C ORGÁNICO Y LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA  
MICROBIANA EN UN ANDISOL CON DISTINTAS ROTACIONES**

**MADLAINE SOLANGE QUIROZ ESPINOZA**

SANTIAGO-CHILE  
2007

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y SU RELACIÓN  
CON EL C ORGÁNICO Y LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA  
MICROBIANA EN UN ANDISOL CON DISTINTAS ROTACIONES**

**ACTIVITY ENZYMATIC EVALUATION AND ITS RELATION WITH  
ORGANIC CARBON AND MICROBIAL ACTIVITY IN ANDISOL  
WITH DIFFERENT CROP ROTATIONS**

**MADELAINE SOLANGE QUIROZ ESPINOZA**

**SANTIAGO-CHILE**  
**2007**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y SU RELACIÓN CON EL  
C ORGÁNICO Y LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA MICROBIANA EN UN  
ANDISOL CON DISTINTAS ROTACIONES**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo  
Mención: Manejo de Suelos y Aguas

**Madelaine Solange Quiroz Espinoza**

PROFESOR GUIA	Calificaciones
Sra. María Teresa Varnero Moreno Químico Farmacéutico	7,0
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
Sr. Juan Pablo Fuentes Espoz Ingeniero Forestal, Ph.D.	6,8
Sr. Marcos Mora González Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,8
<b>PROFESOR COLABORADOR</b>	
Sr. Erick Zagal Venegas Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	

Santiago, Chile  
2007

## ÍNDICE

	<b>Páginas</b>
<b>RESUMEN</b>	1
Palabras claves	
<b>ABSTRACT</b>	2
Key words	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
Hipótesis	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	7
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	8
Lugar del estudio	8
Materiales	8
Métodos	9
Determinación de la Actividad enzimática	10
Determinación de C orgánico del suelo y actividad respiratoria	12
Análisis estadístico	14
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	15
Actividad deshidrogenasa	15
Actividad esterasa o hidrólisis de FDA	16
C orgánico	17
C-CO <sub>2</sub> mineralizado	19
Relación entre actividad enzimática, C-CO <sub>2</sub> mineralizado y COS	21
<b>CONCLUSIONES</b>	24
Comentarios finales	25
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	26
<b>APÉNDICE</b>	

*A mis padres y hermana... mi familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora María Teresa Varnero por su constante apoyo y generosidad durante toda la realización de este trabajo.

Al profesor Erick Zagal por aceptar mi propuesta de trabajar en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción, también quisiera agradecer su constante cooperación y la confianza depositada en mí.

Al profesor David Sepúlveda del Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción, por sus consejos y por enseñarme generosamente la metodología para medir actividad enzimática usada en este estudio.

A todos los académicos y personal del Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción por su amable acogida durante mi estadía en Chillán.

Al Sr. Pablo Undurraga, Jefe del Laboratorio de Suelos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Quilamapu, por facilitarme parte de la infraestructura del laboratorio para la realización de algunos análisis.

Al Sr. Ciro Belmar del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Quilamapu por entregarme valiosa información de terreno.

A mi familia, por el apoyo y confianza incondicional que me han entregado siempre.

## RESUMEN

En un Andisol (medial, amorphous, thermic Humic Haploxerands) de la región del Bío-Bío, Chile (36° 31' lat. Sur, 71° 54' long. Oeste) se midió la actividad microbiológica de un sistema con seis rotaciones bajo distinto manejo agronómico, en un ensayo de campo establecido en la temporada 1992/93. La actividad microbiológica se evaluó a través de actividad enzimática deshidrogenasa y actividad esterasa (hidrólisis de 3',6'-diacetato de fluoresceína (FDA)) y CO<sub>2</sub> mineralizado, a partir de muestras compuestas para la actividad enzimática y muestras no disturbadas de suelo para CO<sub>2</sub> mineralizado. Además, se midió carbono orgánico en muestras compuestas. Se observó un efecto significativo ( $P \leq 0,05$ ) de las distintas rotaciones sobre la actividad microbiológica. Se encontró mayor actividad deshidrogenasa en rotaciones de ciclo largo (tres años cultivo y cinco años pradera) y menor actividad en aquellas rotaciones de ciclo corto (cuatro años cultivo), este efecto también se observó en la hidrólisis de FDA pero fue menos significativo. Se pudo observar que la actividad enzimática medida respondió con mayor sensibilidad que el carbono orgánico a los distintos manejos en este suelo. De esta forma se evidenció que la actividad deshidrogenasa y la hidrólisis de FDA son indicadores que responden a distintos manejos agronómicos y que pueden ser usados como indicadores tempranos de cambios en la actividad microbiológica global del suelo.

Palabras clave: Actividad deshidrogenasa, hidrólisis FDA, C- CO<sub>2</sub> mineralizado, sistema de rotaciones.

## ABSTRACT

In an Andisol (medial, amorphic, thermic Humic Haploxerands) the Bio-Bio Region, Chile, (36° 31' S and 71° 54' W) the microbiological activity of a six-rotation system under different agronomical management practices was measured in a field trial established in the 1992/93 season. The microbiological activity was evaluated based on dehydrogenase enzymatic activity and esterase activity (fluorescein diacetate (3', 6'-diacetylfluorescein) (FDA) hydrolysis) and the mineralized CO<sub>2</sub> from composite samples for the enzymatic activity and undisturbed soil samples for mineralized CO<sub>2</sub>. Additionally, organic carbon was measured in composite samples. A significant effect ( $P \leq 0,05$ ) of the different rotations was observed on the microbiological activity. Greater dehydrogenase activity was found in long-cycle rotations (three-year cropping and five-year pasture) and less activity in short-cycle rotations (four-year cropping). This effect was also observed in FDA hydrolysis, but it was less significant. In this soil enzymatic activity was more sensitive than organic carbon to changes in management practices. It was verified that dehydrogenase activity and FDA hydrolysis are indicators that respond to different agronomical management practices and they can be used as early indicators of change in the global microbiological activity of the soil.

Key words: Dehydrogenase activity, FDA hydrolysis, mineralized C-CO<sub>2</sub>, rotation system.



## INTRODUCCIÓN

La utilización racional de un suelo implica la preservación de la materia orgánica (MO) y de su microflora, con el objetivo de no deteriorar su capacidad de regular la disponibilidad de macro y micronutrientes (Peirano *et al.*, 1992), es decir, que altos niveles de MO correlacionan con niveles altos de fertilidad y productividad del suelo (Bolton *et al.*, 1985; Aguilera *et al.*, 1988; Nannipieri *et al.*, 1990).

Entre los métodos de estudio para conocer la dinámica de la MO y la actividad microbiológica asociada se encuentra la medición de las actividades enzimáticas, ya que la estabilización o degradación de ésta depende fundamentalmente de procesos biológicos en los que las enzimas cumplen un rol importante (Aguilera *et al.*, 1988; Nannipieri *et al.*, 2003). Es así que la medición de la actividad de ciertas enzimas se ha usado como índice de la actividad microbiológica total del suelo (Nannipieri *et al.*, 1990), al igual que otras metodologías como es la medición de la respiración de la microflora edáfica a través del desprendimiento de CO<sub>2</sub> (Nannipieri *et al.*, 1990; Borie *et al.*, 1999; Zagal *et al.*, 2002).

La actividad enzimática en el suelo está asociada a factores bióticos y abióticos. Las enzimas pueden encontrarse intracelularmente en células vivas, muertas o en descomposición, pero también pueden formar temporalmente complejos enzima-sustrato o ser adsorbidas por arcillas, o estar asociadas con compuestos húmicos, o bien pasar a la solución del suelo (lisis celular, por ejemplo) pudiendo cambiar su ubicación en éste (Burns, 1982).

La actividad de las enzimas libres en la solución del suelo tiene una contribución despreciable en la actividad medida en los ensayos de laboratorio debido a su corta vida, ya que están expuestas a procesos de denaturación y degradación. Por el contrario, las enzimas unidas a arcillas o compuestos húmicos contribuyen significativamente a la actividad enzimática medida en dichos ensayos (Nannipieri y Landi, 2000), ya que la asociación con arcillas y humus otorga a la enzima estabilidad y persistencia en el suelo (Burns, 1987; Boyd y Mortland, 1990).

Al estudiar la actividad enzimática en distintos suelos se ha observado que ésta se ve afectada por diversos factores tales como pH, salinidad, temperatura, humedad, presencia o ausencia de iones ya que algunos pueden ser contaminantes o nutrientes para la microflora del suelo (Burns, 1978) y actuar como inhibidores o activadores enzimáticos (Nannipieri y Landi, 2000). En diversos estudios (Bolton, *et al.*, 1985; Bandick y Dick, 1999; Borie *et al.*, 1999), además, se ha descrito la actividad de distintas enzimas, como por ejemplo, deshidrogenasas y esterases como una forma de evaluar la actividad total de la microflora.

La oxidación microbiológica de compuestos orgánicos en condiciones aeróbicas está relacionada a la cadena transportadora de electrones (CTE) asociada a membranas, en la

que el  $O_2$  actúa como aceptor final de electrones y se reduce al combinarse con  $H^+$  para formar una molécula de  $H_2O$  (Nannipieri *et al.*, 1990; Alef y Nannipieri, 1995). Las deshidrogenasas forman parte de la CTE y son fundamentales en los sistemas enzimáticos de todos los microorganismos, cumpliendo un rol esencial en los estados iniciales de la oxidación de la MO del suelo, por transferencia de electrones o  $H^+$  desde sustratos a aceptores (Ross, 1971).

Varios tipos de deshidrogenasas están implicadas en la actividad deshidrogenasa total del suelo (Nannipieri *et al.*, 1990) y catalizan la deshidrogenación de la MO con gran especificidad (Tabatabai, 1982). Por lo tanto, un aumento en la actividad enzimática deshidrogenasa señala una fuerte mineralización del carbono conjuntamente con una gran disponibilidad de recursos energéticos para los procesos biológicos (Borie *et al.*, 1999).

Por otra parte, la actividad deshidrogenasa tiene una relación directa con la biomasa del suelo, sin embargo ello no implica que toda la biomasa participe en esta actividad, ya que depende fundamentalmente de la naturaleza de la microflora y, en alguna medida del hábitat en que ésta se desarrolle (Aguilera *et al.*, 1988).

La determinación de la actividad deshidrogenasa en los suelos está basada en el uso de una sal soluble de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5 – trifenil tetrazolio o TTC) como aceptor artificial de electrones en ausencia de  $O_2$ , el cual es reducido a un compuesto de coloración roja denominado trifenil formazán (TFF) que puede ser determinado por colorimetría (Nannipieri *et al.*, 1990).

Las esterases son enzimas del suelo, que cumplen un rol importante en la remoción de grupos desde el sustrato mediante hidrólisis del enlace ester, por lo tanto catalizan reacciones de hidrólisis en proteínas, polipéptidos, lípidos y fosfolípidos. (Zahir *et al.*, 2001). Así, esterases no específicas como proteasas y lipasas están implicadas en la descomposición de muchos tipos de tejidos en el suelo (Adam y Duncan, 2001) y por lo tanto participan activamente en la degradación de la MO (Nannipieri *et al.*, 2003).

La fuente más importante de síntesis de enzimas corresponde a los microorganismos del suelo (Burns, 1978) y se cree además que, enzimas como por ejemplo las esterases, son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos. Por lo tanto, si se considera que más de 90% del flujo de energía en el suelo pasa a través de la microflora y los microorganismos heterótrofos son predominantes, la actividad esterase estaría estrechamente relacionada con la actividad microbiológica total del suelo (Adam y Duncan, 2001; Green *et al.*, 2006).

La determinación de la actividad esterase es realizada, a través de la hidrólisis de un compuesto no coloreado llamado 3',6'-diacetato de fluoresceína (FDA), el cual es transformado en fluoresceína que corresponde a un compuesto de coloración amarilla que se determina por colorimetría (Nannipieri *et al.*, 1990; Adam y Duncan, 2001; Green *et al.*, 2006) al igual que el pigmento rojo formazán.

La relación de las enzimas del suelo con la fertilidad se refiere a que durante la descomposición de la MO los nutrientes pasan a través de la población microbiana, y mediante sus sistemas enzimáticos asociados, compuestos complejos son degradados a subunidades simples y asimilables por las plantas (Nannipieri y Landi, 2000; Zahir *et al.*, 2001). Es así que la actividad de enzimas asociadas a la síntesis y degradación de la MO ha sido correlacionada con el crecimiento de plantas (Sarkar *et al.*, 1988) y se ha interpretado como una relación directa de la población microbiana y de la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Caldwell, 2005). Los microorganismos entonces, obtienen desde estas transformaciones el suministro energético que necesitan desde compuestos que se encuentran presentes en fuentes orgánicas (Alef y Nannipieri, 1995).

A partir de la MO total del suelo se puede distinguir una fracción activa o lábil y una fracción resistente o recalcitrante (Collins *et al.*, 1992; Haynes, 2005). Generalmente el C orgánico del suelo (COS) lábil consiste de azúcares simples, ácidos orgánicos y proteínas; biomasa microbiana y productos derivados de la microflora que son rápidamente metabolizados. La fracción resistente está conformada por sustancias húmicas, compuestos lignocelulósicos o bien, compuestos en los cuales el C está protegido físicamente (Collins *et al.*, 1992).

Los cambios producidos en la MO total del suelo producto de cambios en las prácticas de manejo son difíciles de detectar, debido a la escasez de antecedentes previos y a la variabilidad natural con que ésta se presenta en el suelo (Haynes, 2005). Sin embargo, la fracción activa o lábil de la MO puede ser más sensible a dichos cambios (Omay *et al.*, 1997).

El método utilizado para determinar el COS total, consiste en una combustión húmeda de MO total del suelo con una mezcla de dicromato y ácido sulfúrico. Una vez ocurrida la reacción se mide el dicromato reducido colorimétricamente (Comisión de Normalización y Acreditación (CNA), 2004).

La medición de la respiración del suelo es otro método utilizado para evaluar la actividad microbiológica que considera la utilización de la MO lábil por parte de la microflora autóctona, liberando la fracción lábil de C desde ésta (Haynes, 2005). Entonces se produce la oxidación de la MO por microorganismos heterótrofos que utilizan C como fuente de energía y cuyos productos finales son CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Alef y Nannipieri, 1995; Haynes, 2005). Por lo tanto, la actividad metabólica de tales microorganismos puede ser cuantificada por medición de la producción de CO<sub>2</sub> (Alef y Nannipieri, 1995).

La tasa de respiración puede ser determinada por incubación, cuyo principio es la captura de CO<sub>2</sub> producido por la respiración desde un suelo húmedo en una solución de NaOH. Entonces la cantidad de NaOH que permanece después de un periodo de incubación conocido es determinada por titulación con un ácido estandarizado (Rowel, 1994).

La actividad enzimática junto al uso de parámetros generales de suelo ha sido considerada como una herramienta que puede ser de gran ayuda, no sólo para evaluar la actividad

microbiológica, sino que permitiría conocer la respuesta del suelo a distintas prácticas de cultivo (Nannipieri *et al.*, 1990).

Se considera que distintas prácticas de manejo como la labranza, la aplicación de fertilizantes, la rotación de cultivos y el manejo de residuos influyen en las transformaciones de la MO del suelo (Dkhar y Mishra, 1983; Bandick y Dick, 1999; Zagal *et al.*, 2002) y, en el caso de éstos últimos manejos, podrían producir un incremento en el COS debido a un aumento en la entrada de fuentes de C al sistema, al incorporar praderas a las rotaciones o incluir cultivos que aporten rastrojo que luego sea incorporado al suelo (Haynes, 2000).

También se ha encontrado que las distintas prácticas de manejo afectan la actividad deshidrogenasa (Bolton *et al.*, 1985) y la actividad esterasa debido a la acción antrópica (Bandick y Dick, 1999; Silva *et al.*, 2004). Por otra parte se ha encontrado que la actividad deshidrogenasa correlaciona con la respiración microbiana (Aguilera *et al.*, 1988), con el C orgánico y la biomasa (Bolton *et al.*, 1985). Además se ha establecido que la actividad esterasa correlaciona con el contenido de MO que presenta el suelo (Bandick y Dick, 1999; Silva *et al.*, 2004) y con la respiración del mismo (Schnürer y Rosswall, 1982). Por todo lo anterior se considera que la medición de la actividad enzimática tiene el potencial de ser un indicador temprano de cambios inducidos por el manejo del suelo y puede ser utilizado como índice de la actividad microbiológica y de fertilidad (Dick, 1984; Sarkar *et al.*, 1988).

En este estudio se determinó la actividad enzimática deshidrogenasa y esterasa (mediante hidrólisis de FDA), la actividad respiratoria microbiana y el C orgánico de un Andisol que ha sido sometido a distintas rotaciones establecidas en la temporada 1992/93.

### **Hipótesis**

- El uso de praderas en la rotación incrementa el contenido de C orgánico, especialmente en rotaciones largas (tres años de cultivo y cinco años de pradera).
- Existe una correlación positiva entre el incremento de C orgánico en el suelo, la actividad enzimática (deshidrogenasa y esterasa) y también la actividad respiratoria del suelo.

### **Objetivo general**

- Evaluar la actividad enzimática deshidrogenasa y esterasa y determinar su relación con la actividad respiratoria y C orgánico de un Andisol cultivado en la VIII Región.

**Objetivos específicos**

- Medir la actividad enzimática deshidrogenasa y esterasa, la actividad respiratoria y C orgánico del Andisol en estudio.
- Evaluar la efectividad de la actividad enzimática, actividad respiratoria y C orgánico como indicadores de cambios en la calidad del suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del estudio

El lugar donde se realizó el muestreo de suelo corresponde al Campo Experimental Santa Rosa, perteneciente al Centro Regional de Investigación Quilamapu, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán (36° 31' lat. Sur, 71° 54' long. Oeste), y corresponde a un ensayo de evaluación de seis rotaciones establecidas en la temporada 1992/93.

Los análisis de medición de actividad enzimática se realizaron en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Suelos de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

### Materiales

El suelo ha sido descrito como serie Arrayán (medial, amorphic, thermic Humic Haploxerands). Esta serie es representativa de suelos volcánicos que se han clasificado en el orden Andisol. El suelo está ubicado en la zona centro sur de Chile y es derivado de cenizas volcánicas jóvenes, conocidos en su forma genérica como suelos trumaos (Stolpe, 2006).

Algunas de sus características físicas son: textura franco a franco limosa, contenido de humedad a capacidad de campo de 45,5% base suelo seco (Zagal *et al.*, 2002), densidad aparente de 0,89 Mg m<sup>-3</sup>. Algunas propiedades químicas son pH en agua 5,98, contenido de C y N total de 4,79 y 0,45% respectivamente; P-Olsen 17 mg kg<sup>-1</sup>. K, Ca y Mg intercambiable de 0,33, 5,75 y 0,48 cmol kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Zagal *et al.*, 2002).

Las rotaciones incluyen las siguientes especies: Remolacha (*Beta vulgaris* L subsp. *vulgaris*), Trigo (*Triticum aestivum* L.), Trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), Frejol (*Phaseolus vulgaris* L.), Cebada (*Hordeum vulgare* L.), Maíz (*Zea mays* L.), Alfalfa (*Medicago sativa* L.) y Trébol blanco (*Trifolium repens* L.).

Rotaciones ciclo corto (4 años): I. Remolacha-trigo-trébol rosado (2 años) (R-T-TR (2 años)), II. Remolacha-trigo-frejol-cebada (R-T-F-C); III. Maíz-trigo-trébol rosado (2 años) (M-T-TR (2 años)); IV. Maíz-trigo-frejol-cebada (M-T-F-C).

Rotaciones ciclo largo (8 años): V. Remolacha-trigo-maíz-alfalfa (5 años) (R-T-M-A (5 años)); VI. Remolacha-trigo-maíz- trébol blanco (5 años) (R-T-M-TB (5 años)).

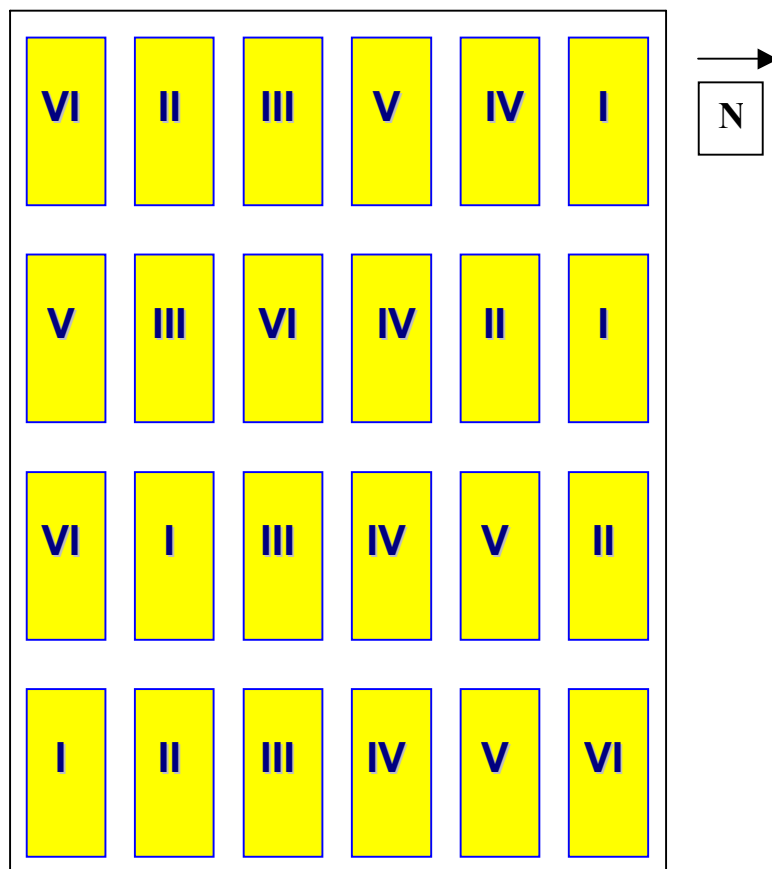


Figura 1. Esquema general del ensayo. Sistema de seis rotaciones establecido en la temporada 1992/93. I. R-T-TR (2), II. R-T-F-C, III. M-T-TR (2), IV. M-T-F-C, V. R-T-M-A (5) y VI. R-T-M-TB (5), con cuatro repeticiones.

### Métodos

Para este estudio las rotaciones se manejaron en parcelas de 560 m<sup>2</sup> (Figura 1). Cada parcela se ha fertilizado desde su establecimiento con una dosis de fertilización de N-P-K según análisis de suelo. En el mes de agosto del 2006, las parcelas se muestrearon en zigzag a una profundidad de 0-10 cm en el caso de praderas y 0-20 cm en el caso de cultivos anuales, obteniendo de cada parcela una muestra compuesta formada por diez submuestras. En total se colectaron 24 muestras compuestas para análisis de actividad enzimática y COS. Para la medición de desprendimiento de C-CO<sub>2</sub> se muestreó a una profundidad de 0-10 cm insertando un tubo de polivinilcarbonato (PVC) (160.4 cm<sup>3</sup>), en total se colectaron 192 tubos. Todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta la realización de los análisis.

El muestreo, para rotaciones de ciclo corto, fue realizado durante rastrojo de trigo; en cambio para las rotaciones de ciclo largo, se realizó durante el cultivo de alfalfa para la rotación V y trébol blanco para la rotación VI (Figura 2).



Figura 2. Sistema de seis rotaciones en un suelo serie Arrayán (medial, amorphic, thermic Humic Haploxerands), bajo distinto manejo agronómico.

### **Determinación de la actividad enzimática**

La actividad deshidrogenasa se midió con el método propuesto por Casida *et al.*, (1964) modificado por Aguilera *et al.*, (1988). Se pesó 3,0 g equivalente a suelo seco tamizado ( $< 2$  mm) y se ajustó el pH a 8,5 con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Luego se mezcló este suelo con 0,5 mL de TTC al 3%, y se agregó agua destilada para humectar el suelo. Posteriormente, se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas después de agitar mecánicamente por 1 min. y se filtró el sobrenadante sobre papel filtro (N°57). El proceso extractivo se repitió varias veces hasta completar 50 mL de metanol y extraer la totalidad del pigmento. La lectura de la muestra se realizó en espectrofotómetro a 480 nm (Genesys 5). La actividad deshidrogenasa se expresó como  $\mu\text{g}$  de TFF  $\text{g}^{-1}$  s.s. (microgramo trifeníl formazán  $\text{gramo}^{-1}$  de suelo seco). La concentración de TFF producida durante la reacción se determinó mediante una curva de calibración, la cual fue elaborada con estándares desde 0 a  $20 \mu\text{g TFF mL}^{-1}$ , tales estándares fueron preparados a partir de una solución estándar de  $40 \mu\text{g TFF mL}^{-1}$  (Figura 3). Los límites de la curva de calibración fueron 0 a 0,874.



La actividad esterasa o hidrólisis de FDA se midió con el método propuesto por Adam y Duncan (2001) modificado. Se pesó 2,0 g equivalente a suelo seco tamizado ( $< 2$  mm) y se agregó 15 mL de buffer fosfato de potasio 60 mM, pH 7,6. Luego se adicionó 0,2 mL de solución diacetato de fluoresceína FDA ( $1000 \mu\text{g FDA mL}^{-1}$ ) para iniciar la reacción. Posteriormente las muestras fueron incubadas a  $30^\circ\text{C}$  durante 20 min. Una vez transcurrido este periodo se agregó 15 mL de acetona para detener la reacción. Luego, se agitó manualmente durante 3 min y el sobrenadante se filtró sobre papel filtro (N°57). La lectura de la muestra se realizó en espectrofotómetro a 490 nm (Genesys 5). La actividad esterasa se expresó como  $\mu\text{g de F g}^{-1}$  s.s. (microgramo Fluoresceína  $\text{gramo}^{-1}$  de suelo seco). La concentración de fluoresceína producida durante la reacción se determinó mediante una curva de calibración, la cual fue elaborada con estándares desde 0 a  $5 \mu\text{g F mL}^{-1}$ , tales estándares fueron preparados a partir de una solución estándar de  $20 \mu\text{g F mL}^{-1}$  (Figura 4). Los límites de la curva de calibración fueron 0 a 0,780.



Figura 3. Solución patrón de TFF con distintas soluciones para elaborar la curva de calibración y realizar las mediciones de actividad deshidrogenasa.

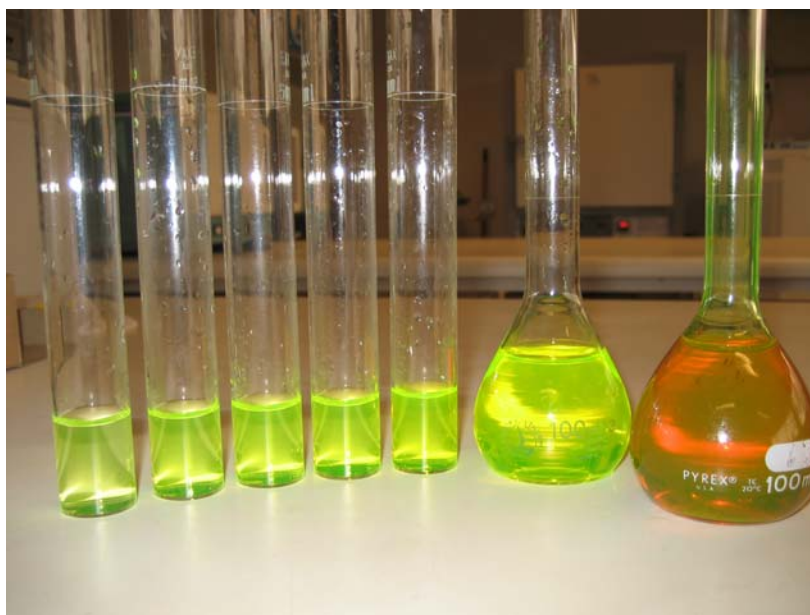


Figura 4. Solución patrón de fluoresceína con distintas soluciones para elaborar la curva de calibración y realizar las mediciones de actividad esterasa (hidrólisis FDA).

### **Determinación de COS y actividad respiratoria**

Se determinó COS mediante oxidación húmeda y colorimetría, de acuerdo al método propuesto por CNA (2004), de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo (SCCS). Se pesó 0.5 g (exactitud 0,01 g) de suelo seco al aire en matraces Erlenmeyer de 125-150 mL. Luego se agregó 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 M y se adicionó 20 mL de ácido sulfúrico, mientras se agitó la suspensión para evitar puntos localizados de ebullición. Posteriormente se agitó y dejó reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos. Se agregó 70 mL de agua, para luego mezclar y dejar reposar durante 12 horas. La lectura de la muestra se realizó en espectrofotómetro a 600 nm (Genesys 5). La concentración de carbono ( $\text{mg de C mL}^{-1}$ ) producida durante la reacción se determinó mediante una curva de calibración y expresando los resultados en porcentaje (%). La curva de calibración se preparó a partir de una serie de estándares de sacarosa desde 0 a 50 mg de  $\text{C mL}^{-1}$  de solución, los cuales se elaboraron desde una solución patrón de sacarosa de 100 mg de  $\text{C mL}^{-1}$ , a partir de dichas soluciones estándares se realizó el proceso de combustión húmeda (Figura 5). Los límites de la curva fueron 0 a 1,128.

La actividad microbiana se midió a través de la respiración del suelo, de acuerdo al método propuesto por Anderson, (1982). Para ello se usó una solución de NaOH 1,0 M como trampa de gases. Las muestras de suelo no disturbadas se llevaron hasta el contenido gravimétrico de agua que correspondió al 60% del espacio poroso lleno con agua (WFPS Water Filled Pore Espace) de acuerdo a la densidad aparente medida en terreno. Posteriormente las muestras se colocaron en frascos del tipo Mason, junto con 25 mL de

NaOH y fueron sellados herméticamente con parafilm (Figura 6). Luego se incubaron a 25°C por nueve días, con controles. El NaOH que no reaccionó con CO<sub>2</sub> se determinó mediante titulación con HCl 0,1 M. Para esto se extrajo 2 mL de NaOH y se adicionó 1 mL de BaCl<sub>2</sub> 1.0 M. Los datos fueron expresados como  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$  suelo seco (105°C).



Figura 5. Soluciones obtenidas a partir de ebullición húmeda desde estándares de sacarosa, para elaborar la curva de calibración y realizar las mediciones de C orgánico.



Figura 6. Determinación de respiración en muestras de suelo no disturbadas utilizando una solución de NaOH como trampa de gases. El CO<sub>2</sub> desprendido desde la muestra difundió y fue absorbido por la solución alcalina.

### **Análisis estadístico**

El diseño experimental correspondió a bloques completos al azar con cuatro repeticiones y dos submuestras por tratamiento. La unidad experimental correspondió a una parcela (Figura 1).

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza o ANDEVA ( $P \leq 0,05$ ), comparaciones múltiples por test de LSD ( $P \leq 0,05$ ) y análisis de correlación ( $P \leq 0,05$ ) de las mediciones de actividad enzimática con C orgánico y actividad microbiana respectivamente. El análisis estadístico se realizó usando el software Statgraphics Plus.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad deshidrogenasa

Se obtuvieron valores promedios de actividad deshidrogenasa que fluctuaron entre 362 y 1192  $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s. (Figura 7). Dichos valores se presentan mayores a los encontrados por Rosas (2001) en un suelo Ultisol de la IX región, cuyos datos fluctuaron entre 67  $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s. en un sistema de labranza tradicional y 388  $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s. para un sistema con cero labranza sin quema. Borie *et al.*, (1999) en un Andisol de la VIII región encontró valores entre 546  $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s. para un suelo con pradera y 845  $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s. para un suelo de bosque.

La inclusión de praderas durante cinco años (R-T-M-A y R-T-M-TB) incrementó significativamente la actividad deshidrogenasa. Por el contrario aquellas rotaciones con una mayor intensidad en el uso del suelo (R-T-F-C y M-T-F-C) presentaron valores significativamente menores (Figura 7).

El aumento en la actividad deshidrogenasa, al incluir praderas en las rotaciones, podría explicarse debido a una mayor entrada de C al suelo proveniente de raíces, exudados y biomasa vegetal (Zagal *et al.*, 2002), y a la disminución de la labranza y la consecuente inversión y disturbación de la capa arable. Además la disminución del laboreo permitiría aumentar la extensión de los periodos de actividad de las raíces (Bolton *et al.*, 1985; Bandick y Dick, 1999), lo cual favorecería la actividad de la microflora.

Por otra parte Johanson (1994), señala que la materia orgánica es preservada por una inadecuada aireación bajo las empastadas lo que finalmente produciría mayor cantidad y disponibilidad de carbono orgánico que sería mineralizado por los microorganismos si se dan las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo.

Es conocido que la labranza del suelo altera en forma negativa la actividad de la microflora (Schnürer *et al.*, 1985; Bandick y Dick, 1999; Borie *et al.*, 1999), tal efecto también se reflejó en las rotaciones R-T-F-C y M-T-F-C.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre R-T-TR(2) y M-T-TR(2), lo cual se atribuyó al bajo rendimiento del cultivo de remolacha que fue afectado por *Rizoctonia sp.* en dicha rotación, además en aquellas rotaciones de ciclo corto (4 años), en las cuales el cultivo que inicia la rotación fue remolacha, presentaron valores significativamente menores que aquellas rotaciones en las cuales el cultivo inicial de la rotación fue maíz. Sin embargo, rotaciones con el mismo cultivo iniciador de la rotación no presentaron diferencias estadísticas significativas.

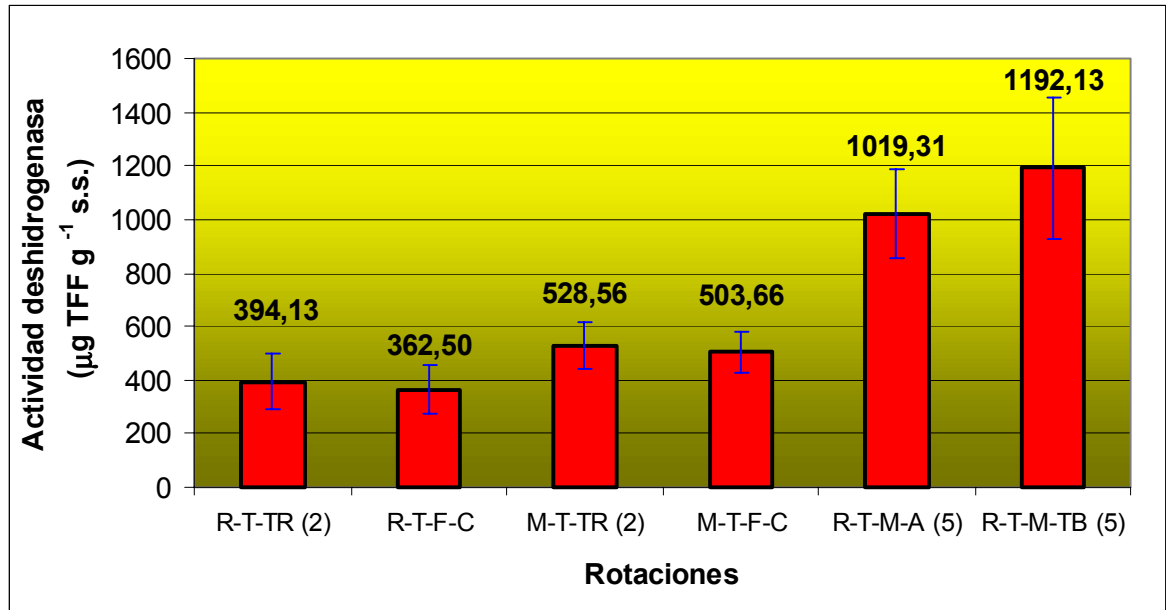


Figura 7. Actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g TFF g}^{-1}$  s.s.) en muestras compuestas superficiales de un suelo serie Arrayán bajo distinto manejo agronómico. Las barras muestran la desviación estandar de las mediciones. R = remolacha; M = maíz; T = trigo; F = frejol; C = cebada; TR = trébol rosado; TB = trébol blanco; A = alfalfa; (2) = 2 años; (5) = 5 años.

### Actividad esterasa o hidrólisis de FDA

Los valores promedios para la hidrólisis de FDA fluctuaron entre 16,51 y 42,40  $\mu\text{g F g}^{-1}$  s.s. (Figura 8) y se encuentran en el rango informado por Pérez (2001) y Castillo (2002) para suelos agrícolas, los cuales fluctuaron entre 15,5 y 74,5  $\mu\text{g F g}^{-1}$  s.s. y 15,5 y 37,2  $\mu\text{g F g}^{-1}$  s.s. respectivamente.

La hidrólisis de FDA, en general, siguió una tendencia similar que la actividad deshidrogenasa, es decir, en aquellas rotaciones que incluyeron praderas durante cinco años presentaron un aumento significativo de la actividad esterasa (Figura 8). Tales resultados podrían explicarse por las mismas razones mencionadas para la actividad deshidrogenasa, ya que ambas enzimas corresponden a indicadores de la actividad microbiológica global del suelo (Bandick y Dick, 1999). Sin embargo, las excepciones a esta tendencia fueron las rotaciones M-T-TR(2) y R-T-M-TB(5) las cuales presentaron hidrólisis de FDA más bajo de lo esperado.

Sin embargo, es necesario considerar que los resultados obtenidos a través de la medición de la hidrólisis de FDA deben ser interpretados cautelosamente, debido a que las

actividades enzimáticas medidas dependen de la contribución de enzimas intracelulares y extracelulares. Como la actividad de enzimas extracelulares asociadas a los coloides persiste en el suelo, incluso en ambientes hostiles, podría limitar la actividad microbológica intracelular (Nannipieri *et al.*, 2002). Por lo tanto, no siempre se obtendrían resultados que relacionen la actividad metabólica proveniente sólo de la microflora edáfica. Dicha relación se esperaría con mayor claridad al medir la actividad deshidrogenasa por tratarse de una oxidoreductasa intracelular.

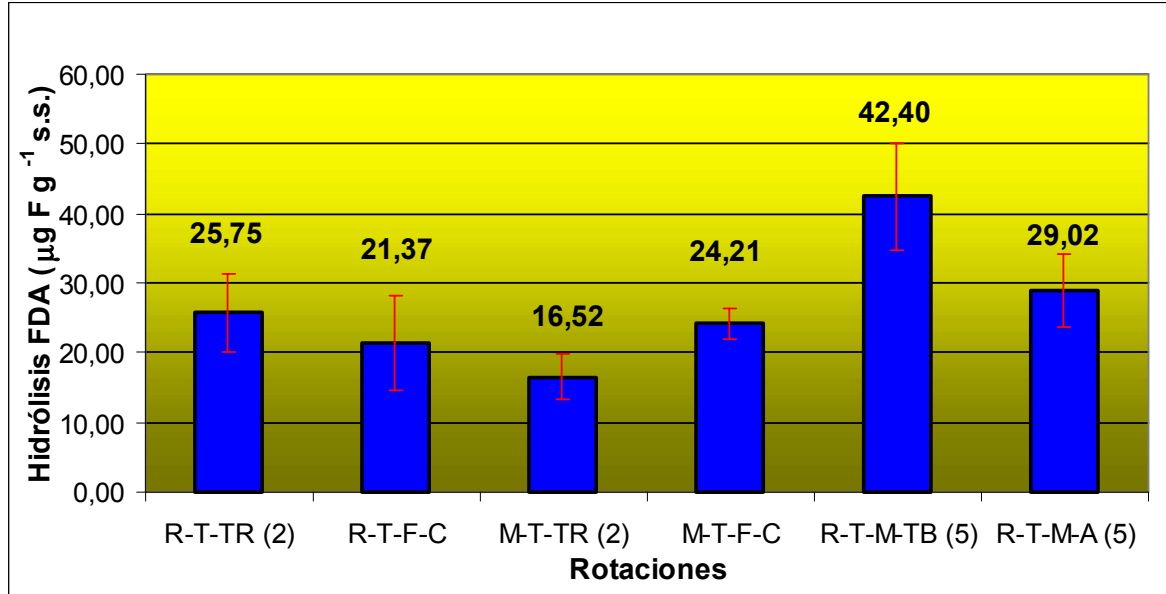


Figura 8. Actividad esterasa o hidrólisis de FDA ( $\mu\text{g F g}^{-1} \text{ s.s.}$ ) en muestras compuestas superficiales de un suelo serie Arrayán bajo distinto manejo agronómico. Las barras muestran la desviación estandar de las mediciones. R = remolacha; M = maíz; T = trigo; F = frejol; C = cebada; TR = trébol rosado; TB = trébol blanco; A = alfalfa; (2) = 2 años; (5) = 5 años.

### C orgánico

Los contenidos de COS fluctuaron entre 4,56% y 5,28% (Figura 9), estos resultados se encuentran en el rango informado por Zagal *et al.*, (2002) para este mismo sistema de rotaciones, tales valores se encontraron entre 4,36% y 5,18%.

El COS, en general, presentó la misma tendencia que la actividad deshidrogenasa (Figura 9), debido a una mayor entrada de C al sistema, ya sea por inclusión de praderas en las rotaciones, aumento en los años de empastadas o incorporación de rastrojo al suelo proveniente del cultivo antecesor en vez de quema o remoción (Haynes, 2005). Similares

resultados obtuvieron Collins *et al.*, (1992) en rotaciones que incluyeron praderas y Omay *et al.*, (1997) al realizar como manejo de la rotación la incorporación de rastrojos de maíz.

A pesar de lo mencionado, la rotación R-T-TR (2) presentó diferencias significativamente menores que aquellas rotaciones que incluyeron praderas y además no presentó diferencias significativas con las rotaciones con mayor intensidad en el uso del suelo. Esta situación se puede explicar por el bajo rendimiento histórico que ha tenido el trébol rosado desde 1992/93 en esta rotación y que sólo aumentó durante la temporada 2003, lo cual no se ve reflejado en las mediciones de COS ya que los cambios en el COS tienden a detectarse en el largo plazo (Haynes, 2005). Además, la rotación M-T-TR(2) no presentó diferencias estadísticas significativas con las rotaciones R-T-M-A(5) y R-T-M-TB (5), lo cual puede ser atribuido a una acumulación de MO durante los dos años de trébol rosado (Haynes, 2000). Pero esta situación, también puede ser atribuida a que el cultivo de maíz (M) proporciona mayor cantidad de rastrojo que el cultivo de remolacha (R), por lo tanto se produciría una mayor entrada de residuos desde el cultivo de maíz al sistema en la rotación M-T-TR(2), similares resultados fueron obtenidos por Omay *et al.*, (1997) en una rotación M-M y M-SB (SB=soya).

El COS presentó menor sensibilidad a los distintos tratamientos en comparación con la actividad deshidrogenasa y la hidrólisis de FDA. Similares observaciones fueron realizadas por Bandick y Dick, (1999) y Zagal *et al.*, (2002). Por ejemplo COS no discriminó entre M-T-TR(2) y R-T-M-A(5), lo cual si se observó en las mediciones de actividad enzimática. Lo anterior se explicaría ya que a través de la medición del COS se mide la MO del suelo, la cual corresponde a una mezcla heterogénea de materiales orgánicos, dentro de los cuales existen residuos altamente susceptibles a la descomposición cuya tasa de reciclaje se mide en días, hasta materiales altamente recalcitrantes con tiempos de reciclaje medidos en milenios (Haynes, 2005).

La actividad enzimática, medida como actividad deshidrogenasa y actividad esterasa, indicaría una medida de la actividad metabólica total del suelo y por lo tanto estaría relacionada con la fracción de la MO lábil o más susceptible a la descomposición, la cual está constituida por los componentes más dinámicos de la MO, que contribuyen a la liberación de nutrientes y que mostraría mayor sensibilidad a las diferentes prácticas de cultivo. Por este motivo, se observa un mayor incremento en los cambios en la actividad enzimática comparado con los cambios en el contenido de COS en las distintas rotaciones. Por otro lado, las determinaciones de COS muestran una mayor variabilidad en las mediciones (alta desviación estándar entre los datos), lo cual estaría asociado al método utilizado para su cuantificación y además podría explicar también, la menor sensibilidad de COS entre rotaciones.



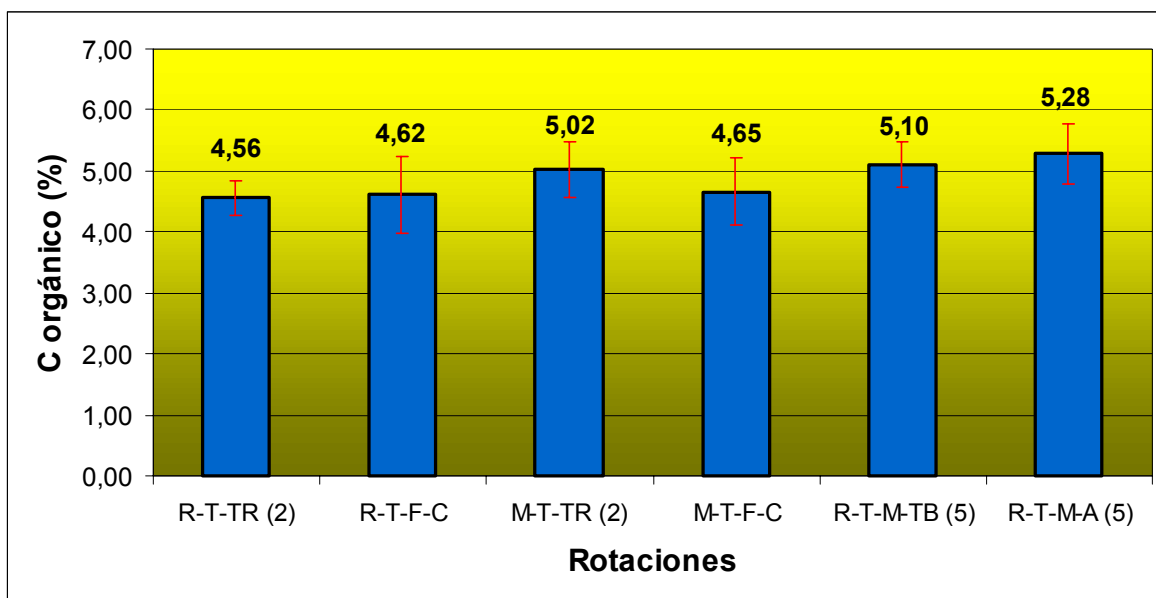


Figura 9. C orgánico (%) en muestras compuestas superficiales de un suelo serie Arrayán bajo distinto manejo agronómico. Se muestra la desviación estandar de las mediciones. R = remolacha; M = maíz; T = trigo; F = frejol; C = cebada; TR = trébol rosado; TB = trébol blanco; A = alfalfa; (2) = 2 años; (5) = 5 años.

### C-CO<sub>2</sub> mineralizado

Los valores de C-CO<sub>2</sub> mineralizado fluctuaron entre 381 y 508  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.s. (Figura 10), estos resultados fueron más altos que los valores informados por Zagal *et al.*, (2002) para este mismo sistema de rotaciones, tales valores se encontraron entre 171 y 465  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.s. para un periodo de incubación de diez días.

Se esperaba que C-CO<sub>2</sub> mineralizado presentara igual tendencia que las tres variables ya mencionadas, lo cual también fue encontrado por Zagal *et al.*, (2002); ya que el C mineralizado durante los días de incubación provendría del componente activo de la MO (Collins *et al.*, 1992). Sin embargo, en este estudio se encontró que en aquellas rotaciones que incluyeron trébol blanco y alfalfa se observaron los valores de C-CO<sub>2</sub> mineralizado más bajos, no presentando diferencias significativas entre si. En el caso de R-T-M-A(5) sólo presentó diferencias significativas con M-T-TR(2), tal rotación presentó la mayor evolución de CO<sub>2</sub> en el sistema de rotaciones.

La baja evolución de CO<sub>2</sub> puede explicarse debido al mayor contenido de agua que se encontró en las muestras de suelo para las rotaciones R-T-M-A(5) y R-T-M-TB(5), que se encontraron entre 70% y más de 70% de WFPS. Por otra parte, al tratarse de muestras de suelo no disturbadas confinadas en un contenedor de PVC, existió una dificultad adicional

para uniformar los contenidos de agua en el laboratorio en aquellas muestras que presentaban exceso de humedad (WFPS mayores a 60%), ya que en estos casos no es posible remover la muestra para promover la evaporación del exceso de agua como se haría para muestras disturbadas. Como una forma de disminuir el exceso de agua en las muestras se introdujeron en bolsas plásticas a 18 °C por 10 días, sin obtener pérdidas de agua de consideración.

Linn y Doran (1984) han informado que muestras de suelo con un contenido de agua de 60% WFPS presentan una actividad respiratoria máxima y que suelos con WFPS menores o mayores que 60% presentarían una actividad microbiológica limitada. Por lo tanto, las muestras de suelo de R-T-M-A(5) y R-T-M-TB(5) al encontrarse con WFPS mayores al 60% habrían presentado menor desprendimiento de CO<sub>2</sub> por predominar en el suelo una condición de anaerobiosis parcial.

En síntesis un alto contenido de agua en el suelo reduce la difusión de O<sub>2</sub> en el espacio poroso, lo que resulta en un aumento de la respiración anaeróbica, tal situación se refleja en una disminución de la producción de CO<sub>2</sub> por parte de los microorganismos aeróbicos del suelo (Linn y Doran, 1984).

Con excepción de las muestras de suelo R-T-M-A(5) y R-T-M-TB(5) las demás rotaciones presentaron un 60% WFPS, por lo que tales resultados pueden ser comparados a los obtenidos por Zagal *et al.*, (2002) para este mismo sistema de rotaciones. Los valores obtenidos para C-CO<sub>2</sub> mineralizado en este estudio resultan más altos que los obtenidos en el año 2002, lo cual puede ser explicado debido a la incorporación de rastrojo de trigo al suelo, práctica que no se había realizado durante el estudio previo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las rotaciones R-T-TR(2), R-T-F-C, M-T-TR(2), M-T-F-C y R-T-M-TB(5), lo que puede ser atribuido a una alta desviación estándar entre los datos.

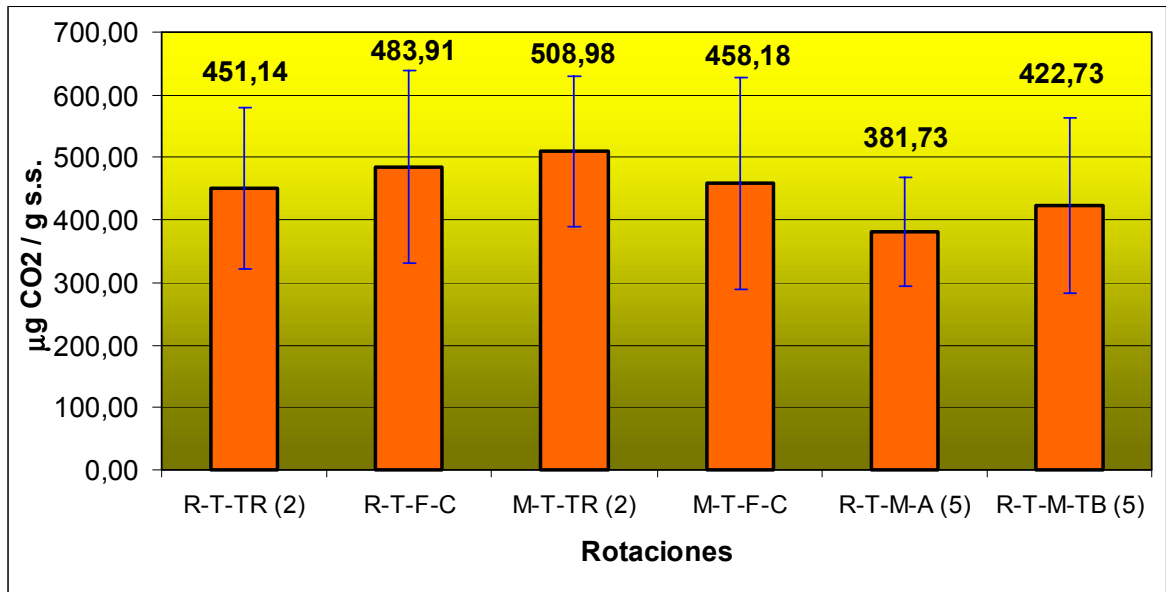


Figura 10. C-CO<sub>2</sub> mineralizado (µg g<sup>-1</sup> s.s.) durante incubación en condiciones controladas (9 días) de muestras compuestas superficiales, no disturbadas, de un suelo serie Arrayán bajo distinto manejo agronómico. Las barras muestran la desviación estandar de las mediciones. R = remolacha; M = maíz; T = trigo; F = frejol; C = cebada; TR = trébol rosado; TB = trébol blanco; A = alfalfa; (2) = 2 años; (5) = 5 años.

### Relación entre actividad enzimática, C-CO<sub>2</sub> mineralizado y COS

De acuerdo con estudios anteriores en otros suelos, la actividad deshidrogenasa (Bolton, *et al.*, 1985; Borie, *et al.*, 1999; Rosas, 2001) y la hidrólisis de FDA (Bandick y Dick, 1999; Pérez, 2001; Castillo, 2002) fueron sensibles a los tratamientos bajo distinto manejo agronómico.

La actividad deshidrogenasa correlacionó significativamente con COS ( $r= 0,90$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 11) y con la hidrólisis de FDA ( $r= 0,70$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 13); no presentando correlación con C-CO<sub>2</sub> mineralizado. Lo cual se explicaría por el bajo desprendimiento de CO<sub>2</sub> en R-T-M-A(5) y R-T-M-TB(5), situación explicada anteriormente. De hecho C-CO<sub>2</sub> mineralizado no presentó correlación con ninguna de las variables medidas. La hidrólisis de FDA presentó una correlación significativa con COS ( $r= 0,49$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Figura 12), Bandick y Dick (1999) también han informado de una correlación significativa entre hidrólisis de FDA y COS. Esta variable presentó menor correlación con COS que la actividad deshidrogenasa y COS, lo que puede ser explicado por la baja actividad presentada en la rotación R-T-M-TB(5).

En general, se esperaba una correlación positiva entre las tres variables medidas y el COS, ya que éstas miden la actividad metabólica que provendría del componente activo de la MO, y reflejaría la acumulación del C lábil que resulta de las distintas prácticas de manejo.

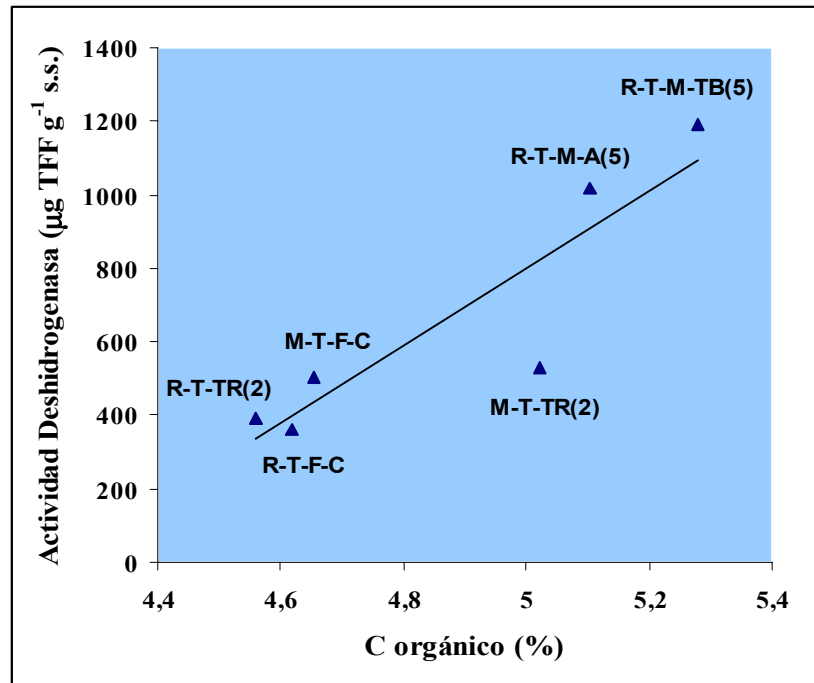


Figura 11. Correlación entre actividad deshidrogenasa con C orgánico del suelo serie Arrayán, medidos bajo distinto manejo agronómico.

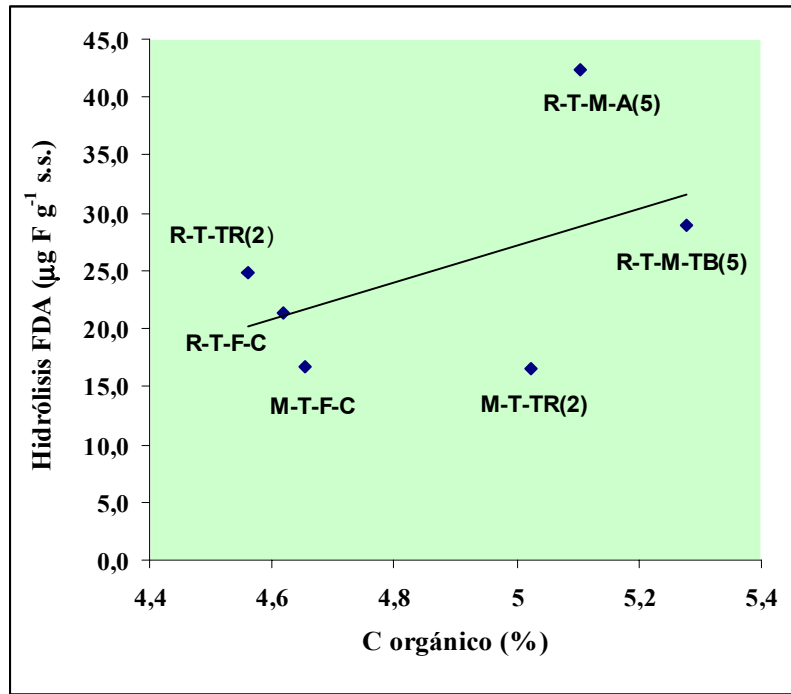


Figura 12. Correlación entre hidrólisis FDA con C orgánico del suelo serie Arrayán, medidos bajo distinto manejo agronómico.

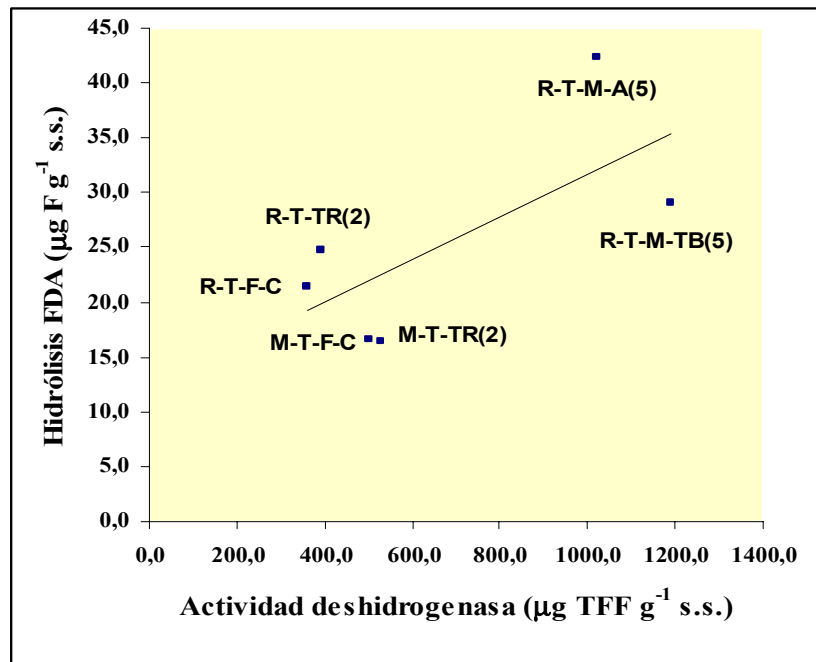


Figura 13. Correlación entre hidrólisis FDA con actividad deshidrogenasa del suelo serie Arrayán, medidos bajo distinto manejo agronómico.

## CONCLUSIONES

En general del presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. La actividad deshidrogenasa es un indicador que responde a distintos manejos agronómicos y puede ser usado como indicador temprano de cambios en la actividad microbiológica y calidad del suelo. En el caso de la hidrólisis de FDA esta situación se presenta con menor claridad, ya que corresponde a una técnica en la cual se mide la actividad de diversas enzimas, incluyendo enzimas intracelulares y extracelulares, pudiendo estas últimas, limitar la actividad microbiológica intracelular.
2. La actividad deshidrogenasa presenta una mayor correlación con el C orgánico que la hidrólisis de FDA.
3. La actividad enzimática medida responde con mayor sensibilidad que el C orgánico a los distintos manejos en este suelo.
4. La respiración del suelo, medida como desprendimiento de CO<sub>2</sub>, en este estudio, no presenta sensibilidad a las distintas prácticas de manejo, debido al exceso de agua presentado en las muestras de suelo estudiadas.
5. Aquellas rotaciones que incluyen cinco años de praderas presentan mayor actividad microbiológica medida como actividad deshidrogenasa que como hidrólisis de FDA; observándose además un aumento en el C orgánico en estas rotaciones.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se acepta la primera hipótesis de trabajo planteada al inicio de este estudio, la cual indica que el uso de praderas en la rotación produce un incremento en el contenido de C orgánico en el suelo (especialmente en rotaciones largas). Sin embargo, la segunda hipótesis de trabajo se acepta parcialmente ya que plantea una correlación positiva entre el C orgánico, la actividad enzimática (deshidrogenasa e hidrólisis de FDA) y también la actividad respiratoria del suelo. Pero de acuerdo a los resultados, sólo se observa una correlación significativa entre el C orgánico y la actividad deshidrogenasa, entre la hidrólisis de FDA y la actividad deshidrogenasa, observándose una tendencia con menor claridad entre la hidrólisis de FDA y C orgánico, no obteniendo una correlación entre esta última variable y el desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

### **Comentarios finales**

Debido a que a través de las actividades enzimáticas evaluadas en este estudio, se mide la actividad microbiológica global del suelo, sería interesante estudiar la actividad de enzimas específicas involucradas en los ciclos de C, N, P y S, pudiendo determinar así el rol que cumplen en los cambios que se producen en la productividad y calidad del suelo debido al manejo agronómico.

Por otra parte, en general, en estudios de actividades enzimáticas, se produce gran variabilidad en los resultados y, en algunos casos, en trabajos diferentes se han obtenido, además, tendencias contradictorias para una misma actividad enzimática, posiblemente debido a la sensibilidad que presentan a las variaciones bióticas y abióticas propias de un sistema heterogéneo como el suelo; por este motivo sería importante estudiar el o los posibles mecanismos que pudieran determinar la estabilidad enzimática en el suelo.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adam, G. and H. Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951
- Alef, K. and P. Nannipieri. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* Academic Press Limited 576p
- Aguilera, M., G. Borie, P. Rokov y P. Peirano. 1988. Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. VII. Determinación de deshidrogenasas. *Agricultura Técnica (Chile)* 48(2): 147-151 (Abril-Junio).
- Anderson, J. 1982. Soil respiration. p 831-871. Number 9. *In:* A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.) *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties.* 2nd ed. Soil Science of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Bandick, A. and R. Dick. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem* 31: 1471-1479
- Bolton, H., L. Elliott, R. Papendick and D. Bezdicsek. 1985. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: Effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biol. Biochem* 3(17): 297-302
- Borie, G., M. Aguilera y P. Peirano. 1999. Actividad biológica en suelos. *Frontera Agrícola (Chile)* 5 (1): 29-32
- Boyd, S. and M. Mortland. 1990. Enzyme interactions with clays and clays matter complexes. pp. 1-28. *En:* J.M. Bollag and G. Stotzky (Ed) *Soil biochemistry.* Vol. 6. Marcel Dekker, New York, NY.
- Burns, R. 1978. *Soil enzymes.* Academic Press, London, UK. 241p
- Burns, R. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 14: 423-427.
- Burns, R. 1987. Interactions of humic substances with microbes and enzymes in soil and possible implications for soil fertility. *Anal. Edaf. Agrobiol.* 46: 1247-1259.
- Caldwell, B. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49: 637-644



Casida, L., D. Klein and T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98: 371-376.

Castillo, A. 2002. Efectos de distintas datas de fertilización orgánica sobre las actividades biológicas en un suelo transicional manejado bajo un sistema orgánico. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile. 70p.

Collins, H. P., P. E. Rasmussen and C. L. Douglas. 1992. Crop rotation and residue management effects on soil carbon and microbial dynamics. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 56: 783-788

Comisión de Normalización y Acreditación (CNA). 2004. Manual de técnicas y procedimientos para el análisis de suelos y tejidos vegetales. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago, Chile.

Dkhar, M. and Mishra, R. 1983. Dehydrogenase and urease activities of maize (*Zea mays* L) field soils. *Plant and Soil* 70: 327-333.

Dick, W. 1984. Influence of long-term tillage and crops rotation combinations on soil enzyme activities. *Soils Science Society of America Journal.* 48:569-575

Green V., D. Stott and M. Diack. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 38: 693–701

Haynes, R. 2000. Labile organic matter as an indicator of organic quality in arable and pastoral soils in New Zeland. *Soil Biol. Biochem.* 32: 211–219

Haynes, R. 2005. Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: An overview. *Advances in Agronomy.* 85: 221-268

Johansson, G. 1994. Production and turnover of roots and root derived organic C. Ph. D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of Soil Science. Uppsala. Sweden.

Linn, D., and J. Doran. 1984. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48:1267-1272.

Nannipieri, P., B. Ceccanti, and S. Grego. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. pp. 293-366. En: J.M. Bollag and G. Stotzky (Ed) *Soil biochemistry.* Vol. 6. Marcel Dekker, New York, NY.

Nannipieri, P. and L. Landi. 2000. Soil enzymes. pp. C129-C135. In: Sumner, M (Ed). *Handbook soil science.* CRC Press, Boca Raton, USA. 2142p.

Nannipieri, P., E. Kandeler, and P. Ruggiero, 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. pp 1-33. In : Burns R. and Dick R. (Eds). *Enzymes in the environment*. CRC Press, New York, USA. 640p.

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

Omay, A. B., C.W. Rice, L.D. Maddux and W.B. Gordon. 1997. Changes in soil microbial and chemical properties under long-term crop rotation and fertilization. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 61: 1672-1678.

Peirano, P., M. Aguilera, G. Borie y M. Caiozzi. 1992. Actividad biológica en suelos volcánicos y su relación con la dinámica de la materia orgánica. *Agricultura Técnica (Chile)* 52: 367-371

Pérez, C. 2001. Estudio de prospección de los cambios en las actividades biológicas en un Andisol sometido a distintos grados de intervención agrícola. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile. 98p.

Rosas, A. 2001. Efectos de distintos sistemas de labranza sobre las actividades biológicas de un suelo Ultisol de la IX región. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile. 84p.

Ross, D. J. 1971. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soil under pasture. *Soil Biol. Biochem* 3: 97-110

Rowel, D. L. 1994. *Soil science methods & applications*. Longman Singapore Publishers Ltda.

Sarkar, J., A. Leonowicz and J. Bollag. 1988. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil. Biol. Biochem.* 2(21): 223-230

Schnürer, J. and T. Rosswall. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 6(43): 1256-1261

Schnürer, J., M. Clarholm, and T. Rosswall. 1985. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organics matter contents. 17: 611-618

Silva, M., E. Siqueira and J., da Silva. 2004. Fluorescein diacetate hydrolysis as a bioindicator of microbial activity in soil under reforestation. *Ciencia Rural*, sept/oct. 5(34): 1493-1496

Stolpe, N. 2006. Descripciones de los principales suelos de la VIII Región de Chile. Publicaciones del Departamento de Suelos y Recursos Naturales. Universidad de Concepción. Chillán. Chile. 84p

Tabatabai, M. 1982. Soil enzymes. p 903-941. Number 9. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.) Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. Soil Science of America, Madison, Wisconsin, USA.

Zagal, E., N. Rodríguez, I. Vidal, L. Quezada. 2002. Actividad microbiana en un suelo de origen volcánico bajo distinto manejo agronómico. *Agricultura Técnica (Chile)* 62(2): 297-309

Zahir, A., M. Ateeq and M. Arshad. 2001. Soil enzymes research: A review. *Journal of biology sciences* 1 (5): 299-307

## **APÉNDICE**

**Cuadro 1. Actividad deshidrogenasa, esterasa (hidrólisis FDA), C-orgánico y C-CO<sub>2</sub> mineralizado.**

Rotación <sup>1</sup>	Deshidrogenasa ( $\mu\text{g TFF g}^{-1}$ s.s.)	Esterasa ( $\mu\text{g F g}^{-1}$ s.s.)	C orgánico (%)	C-CO <sub>2</sub> mineralizado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)
R-T-TR (2)	394 $\pm$ 103,8 d	24,78 $\pm$ 5,59 c	4,559 $\pm$ 0,28 b	451,14 $\pm$ 127,8 ab
R-T-F-C	362 $\pm$ 90,6 d	21,37 $\pm$ 6,74 c	4,619 $\pm$ 0,63 b	483,91 $\pm$ 153,8 ab
M-T-TR (2)	528 $\pm$ 89,1 c	16,51 $\pm$ 3,29 d	5,022 $\pm$ 0,45 a	508,98 $\pm$ 119,7 a
M-T-F-C	503 $\pm$ 75,6 c	16,63 $\pm$ 2,20 d	4,654 $\pm$ 0,55 b	458,18 $\pm$ 168,9 ab
R-T-M-A (5)	1019 $\pm$ 167,8 b	42,40 $\pm$ 7,76 a	5,104 $\pm$ 0,38 a	381,73 $\pm$ 86,9 c
R-T-M-TB (5)	1192 $\pm$ 262,6 a	29,02 $\pm$ 5,20 b	5,279 $\pm$ 0,49 a	422,73 $\pm$ 139,3bc
<sup>2</sup> F razón	90,8	50,89	6,4	3,88
<sup>3</sup> r	0,90			
<sup>4</sup> r		0,70		
<sup>5</sup> r			0,49	

<sup>1</sup> R = remolacha; M = maíz; T = trigo; F = frejol; C = cebada; TR = trébol rosado; TB = trébol blanco; A = alfalfa; (2) = 2 años; (5) = 5 años.

<sup>2</sup> Significativo al nivel 0,05

<sup>3</sup> Correlación entre C orgánico y actividad deshidrogenasa

<sup>4</sup> Correlación entre actividad deshidrogenasa y actividad esterasa

<sup>5</sup> Correlación entre C orgánico y actividad esterasa

<sup>6</sup> Letras distintas indican diferencias significativas entre rotaciones según test de comparaciones múltiples LSD.