

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 4. Actividad de las enzimas fosfatasas del suelo

Marcela Toledo

En el siglo XXI, la prioridad de producir mayores cantidades de alimentos para satisfacer a una población de más de 7 mil millones, con una gran tasa de crecimiento que la ONU (2019) espera sea de 2 mil millones para los próximos 30 años, se suma a la responsabilidad de producirlos bajo un paradigma de sustentabilidad y manteniendo la calidad del suelo, del agua y del aire. Es necesaria para tal finalidad una agricultura sustentable, basada en producir alimentos, manteniendo o mejorando la calidad ambiental, proveyendo recompensas económicas al sector productivo y manteniendo el tejido social de la comunidad rural. Es decir, nos enfrentamos a la imperiosa necesidad de contar con sistemas agrarios equilibrados y sostenidos en el tiempo, respetuosos del medioambiente, rentables, productivos e inclusivos¹.

El uso del suelo, por tal, provoca alteraciones en los atributos del mismo y en su funcionamiento. Los cambios producidos pueden significar la pérdida de calidad con tendencia a la degradación, la preservación de sus propiedades y funciones o un aumento de la calidad del suelo con tendencia al mejoramiento del mismo. La acción antrópica es clave, no solo en el impacto que produce con las actividades realizadas y las decisiones y políticas tomadas, sino también en el seguimiento y monitoreo de los cambios que se van produciendo. Como expresa nuestra Constitución en su artículo 41: «que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes, sin comprometer las de las generaciones futuras».

1. Agradecimiento a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (Unne) por el financiamiento de los proyectos PI 16A007 y PI 12A010.

La Soil Science Society of America considera a la calidad del suelo (CS) como la capacidad del suelo para funcionar dentro de ciertos límites naturales y antrópicos del ecosistema, sustentar la productividad vegetal y animal, mantener la calidad del agua y del aire, promover la salud de plantas, de animales y del hombre, y soportar su habitabilidad (Larson y Pierce, 1991; Doran y Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 1997; De la Rosa, 2008).

Este es un concepto holístico que reconoce al suelo como parte de un sistema de producción diverso y dinámico, con atributos físicos, químicos y biológicos, que se puede cuantificar en escalas temporales específicas, así también reconoce los distintos roles de los suelos en los sistemas naturales y en los sistemas cultivados.

La calidad de un suelo puede impactar en la capacidad de uso de las tierras, en la sustentabilidad agronómica, en la productividad de los campos y en la calidad del aire y del agua. Los cambios en la CS deberán ser identificados y monitoreados para identificar áreas problemáticas, con el fin de asegurar la promoción de prácticas de manejo que favorezcan la productividad y sostenibilidad del sistema, y para realizar los ajustes necesarios y seguir las recomendaciones. Es decir que la determinación de la CS resulta necesaria para evaluar la sustentabilidad de los sistemas productivos y constituye una herramienta fundamental a la hora de tomar decisiones de manejo.

Autores como Wander y Bollero (1999), Dalurzo (2002), Giuffré *et al.* (2006), Villamil, Miguez y Bollero (2008), Rojas (2012) y Toledo (2014), entre otros, han evaluado la sensibilidad de distintos indicadores físicos, químicos y biológicos, y han seleccionado indicadores de calidad a través de la aplicación de técnicas estadísticas univariadas y/o multivariadas.

Los parámetros bioquímicos y biológicos pueden tener un rol fundamental como indicadores tempranos y sensibles de la degradación o de la restauración del suelo, como consecuencia de diferentes prácticas de manejo (Mijangos *et al.*, 2006). Actualmente se ha intensificado su estudio, ya que describen los principales procesos metabólicos que ocurren en el suelo y son de gran utilidad para evaluar la calidad edáfica (Ferrerías *et al.*, 2009).

Numerosas variables edáficas fueron propuestas como potenciales indicadores de calidad en una amplia escala temporal y espacial, y en diferentes sistemas de manejo por su sensibilidad para reflejar cambios. Sin embargo, unos pocos han sido probados y validados (Karlen *et al.*, 1997). Dentro de estos indicadores se destacan el carbono de la biomasa microbiana (Wander y Bollero, 1999), las actividades de las enzimas fosfatasas ácidas (Trasar-Cepeda *et al.*, 1998; Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005; Yoshioka, Sánchez de Prager y

Bolaños, 2006; Toledo *et al.*, 2015), de ureasas, glucosidasas y fosfatasa alcalinas (Trasar-Cepeda *et al.* 1998; Leirós *et al.*, 1999), la respiración del suelo (Doran y Jones, 1996; Karlen *et al.*, 1997; Wander y Bollero, 1999; Dalurzo, 2002), el carbono soluble (Giuffré *et al.*, 2006), la materia orgánica particulada (Wander y Bollero, 1999; Dalurzo, Vazquez y Toledo, 2006; Giuffré *et al.*, 2006; Galantini y Suñer, 2008) y el potencial del suelo para mineralizar nitrógeno (Leirós *et al.*, 1999; Wander y Bollero, 1999; Galvis-Spinola y Hernández-Mendoza, 2004; Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005; Toledo, 2014).

Zornoza *et al.* (2015) efectuaron una revisión acerca de cuáles eran los indicadores más utilizados a nivel mundial en estudios de sistemas forestales, agrícolas, urbanos y de cambios de uso. Concluyó que los indicadores biológicos están menos generalizados en la literatura, y que las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana son las más comúnmente utilizadas en rutinas básicas de evaluación de los sistemas agrícolas y forestales.

Las enzimas son un tipo especial de proteínas que se combinan con un sustrato específico y actúan para catalizar una reacción bioquímica, sin experimentar cambios en su estructura. En términos generales, las enzimas en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclado de nutrientes (Henríquez *et al.*, 2014).

El suelo es un sistema vivo donde las actividades bioquímicas ocurren a través de procesos enzimáticos (Tabatabai, 1994). Algunas enzimas, tales como celulasas, arilsulfatasas y fosfatasa, están relacionadas con las funciones específicas de degradación de sustratos o con la mineralización de nitrógeno (N), azufre (S) o fósforo (P) orgánico del suelo. Los ensayos de actividad enzimática del suelo actúan como indicadores potenciales de la calidad de los ecosistemas al ser operativamente prácticos, sensibles, integradores, y se los ha descrito como «huellas biológicas» por el manejo pasado del suelo y se relacionan con las labranzas y la estructura del suelo (Dick, 2000 citado por Videla y Picone, 2017). Son muchos los factores que influyen en la actividad de las enzimas del suelo: el historial del lote, el agregado de enmiendas, fertilizantes y herbicidas, el tipo de suelo, el pH, la temperatura, el contenido de nitrógeno total y de carbono orgánico, la actividad de la biota, los productos químicos industriales y los pesticidas (Kiss, Dracan-Bularda y Radulescu, 1975; Tabatabai, 1982; Dick, Breakwell y Turco, 1996; Toledo, Dalurzo y Vazquez, 2010; Medina, 2018).

4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FOSFATASAS

En el presente capítulo se describen los pasos a seguir para determinar la actividad a partir del método propuesto por Eivazi y Tabatabai (1977), descrito posteriormente por Tabatabai (1982).

La biota del suelo es tan variada como numerosa, a tal punto que, en un puñado de suelo, el número de organismos (flora y fauna) supera ampliamente el número de personas que habitan hoy en el mundo (7700 millones, Censo, 2019). Tan importante como aún poco conocido es el papel de la biota en el suelo y su impacto en la calidad ambiental.

El componente biológico es central en innumerables procesos y funciones que ocurren en el suelo, desde la descomposición de residuos orgánicos hasta el ciclo biogeoquímico de los nutrientes, la síntesis de sustancias húmicas, la fijación del nitrógeno atmosférico, la formación de la estructura del suelo, la descomposición de productos biodegradables que llegan a él, la inmovilización del nitrógeno y la desnitrificación, entre otros.

Las enzimas son catalizadores orgánicos que disminuyen la energía de activación de las reacciones metabólicas, aceleran las tasas de reacción y permiten que se produzcan a temperaturas y presiones a las que normalmente no tendrían lugar (Browman y Tabatabai, 1978). Son importantes componentes involucrados en el ciclo biogeoquímico de los nutrientes.

En el caso particular del ciclo del fósforo (P) intervienen las enzimas fosfatasa, las que hacen posible que formas orgánicas de P (fosfolípidos, fosfatos de inositol, ácidos nucleicos) sean convertidas a formas inorgánicas o minerales (ortofosfatos mono y diácidos). Conocidas como enzimas fosfatasa o fosfohidrolasa, catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos de H_3PO_4 (Nahas, 2002), son responsables de la mineralización del fósforo orgánico y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas. Naninperi *et al.* (2011) han estudiado en profundidad el rol de las enzimas fosfomonoesterasa en los suelos, las que son significativamente afectadas por el pH, la disponibilidad de P y la materia orgánica. Han sido extensamente estudiadas debido a su importancia en la mineralización del fósforo orgánico, en formas inorgánicas solubles disponibles para las plantas.

Las fosfomonoesterasa se clasifican en enzimas fosfatasa ácidas y alcalinas, y se diferencian por su pH óptimo de catálisis. Al tiempo que las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos (Speir y Ross, 1978; Tabatabai, 1994). Las

enzimas fosfatasas ácidas pueden estar presentes en suelos con valores de pH entre 4 y 6,5, mientras que las alcalinas lo hacen en un rango de 9 a 10. Sin embargo, es común que estén simultáneamente en el suelo (Trasar, Gil y Leirós, 2003). Análisis estadísticos indican que la actividad de las fosfatasas ácidas está correlacionada con los contenidos de carbono orgánico, nitrógeno total y nitrógeno potencialmente mineralizable (r : 0,78; 0,83; 0,69, respectivamente; $P < 0,05$) en la superficie de los suelos (Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005) y con el contenido de arcilla en superficie y en la profundidad del perfil (Tabatabai y Dick, 1979).

El fósforo total (Pt) del suelo contempla una parte inorgánica y otra orgánica. El P orgánico (Po) está asociado al contenido de la materia orgánica y, por lo tanto, es máximo en el horizonte superficial. Representa una fracción muy variable, entre 15% y 80% del P total, según sea el tipo de suelo y su composición (Picone y Zamuner, 2002), siendo la biomasa microbiana su actor central. El porcentaje de Po dependerá de la actividad biológica, la temperatura, la humedad, el pH del suelo, el grado de desarrollo del suelo y la textura. En líneas generales, tanto en áreas cálidas como templadas, cuanto más fina sea la textura, mayor será el contenido de Pt (Pellegrini, 2017). La importancia de las formas orgánicas del P en la nutrición fosfatada de las plantas en áreas tropicales ha sido demostrada en varios estudios (Beck y Sánchez, 1994; Maroko, Buresh y Smithson, 1999).

Del fósforo total del suelo, una parte se encuentra en forma soluble y está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. Por otro lado, en las formas insolubles o fijadas, el P se encuentra principalmente como parte de minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de calcio, hierro, aluminio y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados. Además de la biomasa microbiana, el P orgánico extractable con NaHCO_3 compone la fracción orgánica lábil que estaría disponible para las plantas o microorganismos en un período corto de tiempo, del orden de días o semanas (Cross y Schlessinger, 1995 citados en Picone y Zamuner, 2002). Halm, Stewart y Halstead (1972) encontraron que el P orgánico lábil extractable con 0,5 M de NaHCO_3 se correlacionaba positivamente con la actividad de la enzima fosfatasa y la población microbiana.

En Argentina, en horizontes superiores de vertisoles y alfisoles de la provincia de Entre Ríos, el Po oscila entre el 41% y 74% del P total (Boschetti *et al.*, 2000; Pascale, Heredia y Giuffré, 2000). En suelos molisoles del sudeste de la provincia de Buenos Aires, el Po representa entre el 78% y 83% del P total (Diez *et al.*, 2000; Picone

et al., 2003) y en el sur de Misiones, en ultisoles y oxisoles, el Po posee entre el 18% y 28% del P total, respectivamente (Vazquez, Dalurzo y Lifschitz, 1998). En oxisoles prístinos bajo selva subtropical, con 4% de carbono orgánico, se han encontrado valores superiores a 880 ppm de Pt y de 4 a 6 ppm de P disponible para las plantas (Toledo, Dalurzo y Vazquez, 2007).

En resumen, el P en el suelo se presenta casi exclusivamente como ortofosfato, y todos los compuestos son derivados del ácido fosfórico (H_3PO_4). La mineralización del P orgánico (Po) depende de la actividad de las enzimas fosfatasas que participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica y pueden tener un rol fundamental como indicadores tempranos y sensibles de los cambios que ocurren en el suelo por efecto del uso de las tierras (Leirós *et al.*, 1999; Yoshioka, Sánchez de Prager y Bolaños, 2006; Toledo *et al.*, 2015). Naninperi *et al.* (2011) evaluaron la contribución de las actividades de las fosfomonoesterasas –ubicadas de manera diferente en la matriz del suelo– a la actividad enzimática medida e identificaron los inconvenientes de los ensayos o determinaciones utilizados.

4.2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método propuesto por Eivazi y Tabatabai (1977) es rápido y preciso (Tabatabai, 1994). La determinación de la actividad de la fosfatasa ácida o de la fosfatasa alcalina se basa en la medida espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado (PNF, de coloración amarilla) después de la incubación del suelo a 37 °C, con una disolución tamponada de p-nitrofenil fosfato disódico de pH 6,5 o pH 11, utilizado como sustrato (PNP incoloro), y tolueno. La actividad enzimática es expresada en mg de p-nitrofenol liberado por kg de suelo seco o en μg de p-nitrofenol g^{-1} suelo. h^{-1} y brinda información acerca del potencial del suelo para mineralizar Po.

Las temperaturas superiores a 60 °C inactivan o desnaturalizan las enzimas. Se da por sentado que la incubación a una temperatura de 37 °C no afecta la actividad-estabilidad (concentración) de las enzimas y para el caso de las enzimas fosfatasas del suelo, esta premisa fue comprobada por Tabatabai y Dick (1979).

El p-nitrofenol liberado durante la incubación por la actividad de las enzimas fosfatasas que actúan sobre el sustrato enzimático (p-nitrofenil fosfato disódico) se recoge en un medio alcalino (cloruro de calcio e hidróxido de sodio). El cloruro de calcio se utiliza para evitar interferencias de las sustancias húmicas con la dispersión de los minerales de arcilla (Eivazi y Tabatabai, 1977; Tabatabai, 1982).

La concentración de H⁺ afecta a enzimas, sustratos y cofactores, al alterar su ionización y solubilidad. Hay rangos de pH que resultan óptimos para cada enzima por fuera de los cuales su actividad disminuye (Eivazi y Tabatabai, 1977; Browman y Tabatabai, 1978). No solo existen rangos de pH, sino también de temperaturas en los que la actividad de cada enzima es óptima y, por fuera de ellos, la actividad y la capacidad catalítica se ven afectadas (Browman y Tabatabai, 1978). El uso de una solución tamponada o buffer a un pH óptimo para la actividad de la enzima permite mantener el pH deseado durante la reacción mientras dura la determinación analítica. Para fosfatasa ácida, se utiliza una solución tamponada a pH 6,5 y para fosfatasa alcalina, a pH 11. El procedimiento para su determinación es idéntico, como se verá más adelante.

Por otra parte, la adición de tolueno en la mezcla de incubación no afecta la actividad de las enzimas fosfomosterasas significativamente (Eivazi y Tabatabai, 1977). Por tratarse de un hidrocarburo de tipo aromático, es necesario utilizar máscaras protectoras, guantes y ropa de protección y, en lo posible, trabajar bajo campanas extractoras.

En los métodos espectrofotométricos se mide la intensidad de luz (energía radiante o radiación electromagnética) para determinar la concentración del analito presente en una muestra (en este caso, el p-nitrofenol liberado). Utilizando la espectrofotometría de absorción, medimos la absorbancia del analito –esto es, la luz absorbida– y esta magnitud se relaciona con la concentración del mismo sobre la base de la Ley de Lambert-Beer (Díaz *et al.*, 2010). Para transformar la lectura de absorbancia en concentración del analito, es necesario realizar primero lo que se denomina curva o gráfica de calibración. Para ello, se preparan soluciones del analito de concentración conocida, las que se utilizan para obtener el complejo coloreado. A continuación, se mide en el espectrofotómetro la absorbancia del complejo obtenido a una determinada longitud de onda para cada concentración conocida de analito.

En resumen, obtendremos una serie de pares de valores conocidos (concentración conocida de p-nitrofenol y su absorbancia correspondiente). Cuanto mayor sea la concentración de p-nitrofenol utilizada, mayor será la intensidad del color amarillo obtenido y, por lo tanto, mayor la absorbancia medida en el espectrofotómetro.

4.3. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

La determinación de la actividad de las enzimas del suelo constituye un medio para estimar el potencial de degradación o transformación de los sustratos orgánicos y cuánto y cómo llevan a cabo importantes pasos en el ciclo de nutrientes, indicando el nivel de los procesos.

En este caso, la determinación de la actividad de las enzimas fosfatasas provee un índice del potencial del suelo para mineralizar el fósforo orgánico y no la actividad misma de las enzimas, ya que las determinaciones se producen en ambientes controlados y no en las condiciones de campo que ocurren en cada caso en particular (pH, humedad del suelo, temperatura, sustrato enzimático natural, como ácidos nucleicos, entre otros).

4.4. EQUIPAMIENTO

Los elementos necesarios para detectar la actividad de las enzimas fosfatasas del suelo son los siguientes:

- Campana extractora.
- Balanza analítica de precisión.
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Estufa de 0 a 50 °C o un incubador con control de temperatura.
- Cronómetro.
- Termómetro de 0 a 100 °C.
- Erlenmeyers de 50 ml y tapones o frascos de vidrio de 50 ml con tapa plástica a rosca, matraces, vasos de precipitado, matraz aforado de 10 ml, embudos, papel de filtro tipo Whatman N° 2 o similar, bandejas plásticas.

4.5. REACTIVOS DE CALIDAD PROANÁLISIS

Los reactivos necesarios son los siguientes:

- Tolueno.
- Solución MUB a pH 6,5 (Modified universal buffer pH 6,5): solución buffer o solución tampón modificada a pH 6,5 (para fosfatasas ácidas) de p-nitrofenil fosfato de sodio.
- Solución PNP: solución de p-nitrofenil fosfato 0,05 M.
- Solución estándar de p-nitrophenol.

- Cloruro de calcio 0,5 M.
- Hidróxido de sodio 0,5 M.

4.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Los pasos a seguir para acondicionar el material disponible son los siguientes:

4.6.1. Toma y acondicionamiento de muestras de suelo

Un axioma de Jackson (1964) expresa que «un análisis no puede ser mejor que la muestra». Generalmente, este factor es menospreciado, tanto a nivel de campo como de laboratorio, cuando en realidad es una parte fundamental del resultado que se obtenga.

En general, el muestreo para determinar parámetros biológicos requiere de consideraciones especiales debido a la dinámica misma de los procesos biológicos que ocurren en los suelos. Principalmente, es importante la época del año en que se extraen las muestras, pues las estaciones del año definen las temperaturas y precipitaciones, y estas varían con la ubicación geográfica y el clima de cada lugar. Si se van a tomar varias muestras durante el año, es recomendable que las mismas se distribuyan a lo largo de las estaciones. Si solamente se va a efectuar el muestreo una vez en el año, se recomienda hacerlo durante la estación en que las condiciones de temperatura y humedad del suelo se encuentran más estables y lejos de disturbios (Dick, Breakwell y Turco, 1996).

Sugiero que el muestreo se realice durante los meses de otoño para la región del Nordeste argentino y alejado de disturbios importantes, como las labranzas, el encalado, la incorporación de rastrojos o el agregado de enmiendas orgánicas, entre otros, ya que pueden alterar momentáneamente la actividad enzimática y no representar el comportamiento del sistema a largo plazo. Para estudios con fines de fertilidad, al ser el P un elemento poco móvil y presentar en general alta variabilidad, es importante tomar un número suficiente de muestras compuestas de suelo de 0 a 0,10 m y de 0,10 a 0,20 m de profundidad y transportarlas lo más rápidamente al laboratorio, sin dejarlas expuestas al sol.

Una vez en el laboratorio, si las muestras serán analizadas en el corto plazo, se las debe acondicionar distribuyéndolas en bandejas plásticas y dejando que se sequen al aire, a fin de homogenizar el estado de humedad de las mismas, en equilibrio con la humedad del ambiente. En caso de que las determinaciones analíticas se realicen más adelante, se recomienda conservar las muestras de suelo a 4 °C con la humedad de campo hasta el momento de

utilizarlas. No obstante, también puede optarse por secarlas al aire y luego colocarlas a 4 °C, ya que Baligar, Wright y Smedley (1988) encontraron que la actividad medida en muestras húmedas o secas al aire conservadas a 4 °C presentan alta correlación.

El secado al aire puede afectar la actividad de las enzimas. Según sea el tipo de enzimas, la estabilidad puede disminuir en algunas y en muchas otras mantenerla sin cambios durante varias semanas e incluso meses hasta el análisis (Dick, Breakwell y Turco, 1996). Con respecto a este punto, estudios previos realizados por algunos autores demostraron que la actividad enzimática no se afectó por el tratamiento de secado al aire en comparación con el uso de la muestra con la humedad de campo (Henríquez *et al.*, 2014). En cuanto a la acción de la luz, estudios previos realizados por la autora demostraron que la actividad enzimática no se vio afectada cuando la determinación se realizó en ausencia de luz, en comparación con la presencia de luz en el laboratorio (datos no publicados).

Una vez secas al aire, las muestras deben ser molidas con mortero y pilón de porcelana o con molinillo de suelos, luego pasadas por un tamiz de malla de 2 mm (N° 10) y de esta manera se obtiene la llamada «tierra fina» a partir de la que se procede a realizar el análisis.

4.7. PROCEDIMIENTO

Para una mayor precisión, las mediciones siempre se deben realizar por triplicado².

2. Algunas consideraciones. La curva de calibración deberá realizarse cada nuevo día en que se realicen lecturas, ya que los factores sufrirán variaciones conforme al estado de las soluciones y a factores ambientales. En caso de utilizar una estufa, calibrar la temperatura en 37 °C al menos 24 horas antes de incubar y controlar repetidas veces con termómetro extra para asegurar que se haya llegado a una temperatura equilibrada. La alícuota a tomar del filtrado obtenido en el paso 3 varía con los suelos y la actividad enzimática que presenten. Normalmente con 1 o 2 ml es suficiente, pero puede suceder que se requiera una alícuota mayor si la actividad es más bien baja o diluciones si es muy alta. Conservar las soluciones de PNP y MUB en heladera, en matraces tapados. En el paso 3, una vez adicionados el CaCl₂ y el NaOH, es importante filtrar inmediatamente para evitar precipitados. De ser necesario, se puede centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos antes de efectuar la lectura en absorbancia. En ensayos donde el tiempo de incubación es corto, el agregado de tolueno (inhibidor microbiano) detiene la síntesis de enzimas por las células vivas y previene las reacciones de asimilación de productos (Tabatabai, 1982).

1. En un Erlenmeyer de 50 ml, colocar 1 g de «tierra fina», agregar 0,2 ml de tolueno (añadido gota a gota a las paredes de vidrio), 4 ml de solución MUB y 1 ml de solución PNP. Mover suavemente el Erlenmeyer en círculos durante unos segundos para facilitar la mezcla de contenidos y cerrar con tapón.
2. Llevar a incubación durante 1 hora a 37 °C. Al cabo de ese tiempo, retirar de la estufa o incubadora, colocar bajo campana extractora, dejar enfriar y luego destapar.
3. Adicionar 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M. Nuevamente mover suavemente el Erlenmeyer en círculos durante unos segundos y filtrar la suspensión resultante utilizando papel Whatman N° 2 o similar. Recoger el filtrado.
4. Colocar una alícuota (1 o 2 ml) del filtrado en un matraz aforado de 10 ml y llevar a volumen con agua destilada a 10 ml finales, mezclar suavemente y proceder a la cuantificación del p-nitrofenol liberado –manifiesto en la intensidad del color amarillo– utilizando un espectrofotómetro o fotocolorímetro. Efectuar la lectura en absorbancia a una longitud de onda de 410 nm, previa calibración del equipo. Si la intensidad del color amarillo desarrollado excede la del patrón de 50 μg de p-nitrofenol, deberán efectuarse las diluciones que sean necesarias, tomando una alícuota del filtrado y agregando agua destilada hasta que la lectura realizada en el fotocolorímetro entre en la escala de calibración.
5. Calcular el p-nitrofenol contenido en el filtrado a partir de los niveles de referencia graficados en la curva de calibración, correspondiente a lecturas obtenidas de los estándares que contienen 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de p-nitrofenol.
6. Realizar un control o blanco de reacción por cada muestra de suelo analizada siguiendo los pasos 1, 2 y 3, excepto que el agregado de 1 ml de PNP (sustrato) para el caso del control deberá hacerse después del agregado del CaCl_2 y del NaOH e inmediatamente antes del filtrado. Es decir que, en el caso del control, el sustrato enzimático se agrega solo después de la incubación. El control debe realizarse con cada suelo analizado para detectar el color que no deriva del p-nitrofenol liberado por la actividad de la fosfatasa. De manera que, a la lectura de absorbancia de cada muestra de suelo analizada, se le deberá restar la de su respectivo control. Posteriormente, el valor de absorbancia así obtenido (L) se interpola en una curva de calibración para obtener finalmente el valor de la actividad enzimática o se aplica la formulación detallada en este capítulo.

7. Obtener una gráfica de calibración para realizar los estándares arriba mencionados. En un matraz aforado de 100 ml, preparar una solución estándar diluida (SED) de la siguiente manera: colocar 1 ml de solución estándar de p-nitrofenol, diluir hasta 100 y enrasar. Tapar el matraz y agitar suavemente durante unos segundos para permitir la mezcla homogénea de la solución. A continuación, construir los patrones o estándares tomando alícuotas 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la solución estándar diluida (SED) y colocarlos en Erlenmeyers de 50 ml, agregar agua destilada en cantidad necesaria hasta completar en cada caso los 5 ml finales. Luego, agregar 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M, agitar suavemente unos segundos, filtrar con papel Whatman N° 2 o similar y recoger el filtrado. En los filtrados realizar las lecturas utilizando el espectrofotómetro o fotocolorímetro en absorbancia a 410 nm y construir la gráfica correspondiente con las lecturas de los patrones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de p-nitrofenol.

4.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se deben preparar las siguientes soluciones:

- a. **Solución Buffer Universal (MUB) Stock.** Reactivos: Na (OH) 1 M, Tham, Tris (hidroximetil) aminometano, ácido maleico, ácido cítrico, ácido bórico. En un matraz aforado de 250 ml, disolver 3,025 g de Tham, 2,9 g de ácido maleico, 3,5 g de ácido cítrico y 1,575 g de ácido bórico en 122 ml de Na (OH) 1 M. Llevar a volumen con agua destilada hasta completar 250 ml. Guardar en un refrigerador.
- b. **Solución Buffer Universal (MUB) a pH 6,5 (para Enzimas Fosfatasas Ácidas).** En un vaso de precipitado de 500 ml, colocar 200 ml de la Solución Buffer Universal (MUB) Stock. Mediante el uso de HCl 0, 1 N y de un agitador magnético, valorar el pH de la solución hasta 6,5. Trasvasar a un matraz aforado de 1 litro y llevar a volumen con agua destilada. Guardar en un refrigerador. Para determinar la actividad de las *enzimas fosfatasas alcalinas*, se emplea la misma metodología aquí descrita, pero cambiando el pH, mediante el uso de una *Solución Buffer Universal (MUB) a pH 11*. Para elevar el pH, se recomienda emplear hidróxido de sodio 0,1 M.

- c. **Solución estándar de p-nitrofenol.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 0,25 g de p-nitrofenol en aproximadamente 20 a 30 ml de agua destilada, luego llevar a volumen hasta 250 ml con agua destilada. Guardar en un refrigerador.
- d. **Solución de p-nitrofenil fosfato disódico (PNP) 0,05 M.** En un matraz aforado de 50 ml, disolver 0,84 g de disodios para nitrofenil fosfato tetrahidrato en 40 ml de MUB pH 6,5 (para fosfatasa ácida), llevar a volumen y enrasar a 50 ml con la misma solución. Conservar en heladera y proteger de la acción de la luz, para lo cual se recomienda colocar el matraz dentro de una bolsita plástica negra o en un frasco caramelo. *Observaciones:* la solución PNP es incolora. Se utiliza como sustrato enzimático y puede ser empleada en una concentración de 0,05 M, como en este caso (Dick, Breakwell y Turco, 1996), pero también en una concentración de 0,025 M (Tabatabai, 1982). Las soluciones de los sustratos usados para el ensayo de fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas son estables durante varios días si se almacenan en un refrigerador (Tabatabai, 1994). Una vez abierto el disodios para nitrofenil fosfato tetrahidrato, es conveniente conservarlo a ≤ 4 °C. Existe la posibilidad de aplicar esta metodología aquí descrita, obviando el uso de tolueno (Tabatabai, 1994; Effron *et al.*, 2006; Medina, 2018).
- e. **Cloruro de calcio 0,5 M.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 18,375 g de $\text{Cl}_2 \text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, en 175 ml de agua destilada y luego continuar agregando agua hasta llevar a volumen final de 250 ml.
- f. **Hidróxido de sodio 0,5 M.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 5 g de hidróxido de sodio en 175 ml de agua destilada y luego llevar a volumen final de 250 ml. La reacción es exotérmica, por cuanto es importante trabajar con material tipo Pyrex y siempre apoyando el matraz previamente sobre un paño o una placa atérmica.

4.9. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se calcula la cantidad de p-nitrofenol liberado durante la incubación y contenido en los filtrados, utilizando la curva de calibración construida con cantidades conocidas de p-nitrofenol.

Para el cálculo de la actividad de la fosfatasa en mg p-nitrofenol. kg⁻¹ de suelo. h⁻¹, sobre la base del contenido de p-nitrofenol liberado durante la incubación, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{mg p-nitrofenol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}=\text{L}*\text{Fc}*\text{Fd}*1000/1000$$

Donde: L es la lectura en absorbancia, Fc el factor de calibración que se obtiene promediando las lecturas de absorbancia obtenidas para los patrones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg, Fd es el factor de dilución. Consignar en caso de haber efectuado diluciones.

Como la actividad de las enzimas está operativamente definida, si las condiciones de la determinación analítica son alteradas (ejemplo: temperatura de incubación, pH solución buffer, fuerza iónica), los resultados también cambiarán (Dick, Breakwell y Turco, 1996). Por lo tanto, es muy importante respetar el protocolo de determinación cuando se quieran hacer comparaciones de la actividad de las enzimas en diferentes suelos dentro de un mismo estudio. El procedimiento descrito es estándar y está contemplado en la literatura.

En la bibliografía en general, la actividad de las enzimas está expresada por kg o g de masa de suelo, pero también puede resultar de interés expresarla en términos volumétricos o en unidades de área por profundidad de suelo para proveer una perspectiva ecológica.

Para expresar en términos volumétricos, será necesario contar con el dato de densidad aparente del suelo correspondiente a la profundidad analizada.

A continuación, se han tabulado valores encontrados en la literatura, mostrando una serie de rangos y de valores medios para la actividad enzimática de las fosfatasas que han sido obtenidos aplicando el protocolo propuesto en este capítulo. No obstante, los valores son limitados e incompletos, ya que existen diferentes ambientes y tipos de suelos, usos de suelo y prácticas de manejo, valores que no incluyen a todos. En conclusión, lo ideal es trabajar aplicando el protocolo en distintos ambientes, prácticas agronómicas y suelos, e ir calibrando los valores para cada caso, de manera que las actividades de las enzimas deben ser interpretadas con precaución y teniendo en cuenta la evaluación de otros atributos de la calidad del suelo.

Tabla N° 1. Valores medios y rangos de la actividad de las fosfatasa ácidas (APA) y de las alcalinas (APAL) obtenidos con el método aquí descripto y encontrados en la literatura

Actividad de la fosfatasa ácida (APA) mg p-nitrofenol .kg⁻¹ de suelo.h⁻¹			
	Rango	Valor medio	Procedencia
Suelo seco al aire	80 a 1112	284	USA, Australia, Dinamarca n=11 ¹
Suelo seco al aire	96 a 1039	427 (prístino) 256 (forestal-Pinus sp.) 223 (agrícola)	Suelos rojos, Misiones, Argentina Rango: n=144 Medias: n=12 ²
Suelo seco al aire	79 a 633	569 (Alfisol-suelo virgen) 561 (Vertisol-suelo virgen) 443 (Vertisol- Setaria sp.) 352 (Alfisol con pastos naturales-ex-arrocera)	Corrientes, Argentina Rango: n=10 ³
Suelo a humedad de campo	23 a 2100	617	EE. UU., N. Zelanda y Europa n=46 ⁴

¹ Dick, Breakwell y Turco (1996). ² Toledo (2014).

³ Arzuaga *et al.* (2005). ⁴ Dick, Breakwell y Turco (1996).

Tabla N° 2. Valores medios y rangos de actividad de las fosfatasa alcalinas (APAL) obtenidos con el método aquí descripto y encontrados en la literatura

Actividad de la fosfatasa alcalina (APAL) mg p-nitrofenol .kg⁻¹ de suelo. h⁻¹			
	Rango	Valor medio	Procedencia
Suelo seco al aire	18 a 381	144	EE. UU., n=11 ¹
Suelo a humedad de campo	11 a 1000	122	EE. UU., n=17 ²

¹ Dick, Breakwell y Turco (1996). ² Dick, Breakwell y Turco (1996).

Tabla N° 3. Valores medios de la actividad de las fosfatasa ácidas (APA) obtenidos en superficie para suelos de Argentina al aplicar PNP como sustrato enzimático

Uso	APA (mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹ ó µg p-nitrofenol. g ⁻¹ .h ⁻¹)	Orden de suelo y procedencia
Selva paranaense	698	Oxisol (Pcia. Misiones) ¹
Agrícola-Cultivo de Tabaco	275	Oxisol (Pcia. Misiones) ²
Agrícola-Citrus	270	Oxisol (Pcia. Misiones) ³
Agrícola-Arroz	437	Alfisol (Pcia. Corrientes) ⁴
Agrícola-Citrus	151	Entisol (Pcia. Corrientes) ⁵
Forestaciones con quebracho colorado chaqueño	255	Alfisol (Pcia. del Chaco) ⁶
Agrícola-Yerba mate	251	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁷
Selva subtropical	671	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁸
Agrícola-Cultivo de Té	197	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁹
Agrícola-Maíz monocultivo	249	Oxisol (Pcia. Misiones) ¹⁰
Monte-Urunday y Guayacán	≈800	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹¹
Monte-Espina corona	≈1000	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹²
Monte-Mora	≈1300	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹³
Suelo de referencia	598	Molisol (Marcos Juárez, Córdoba) ¹⁴
Agrícola-Soja-siembra directa- con cultivo de cobertura	567	Molisol (Marcos Juárez, Córdoba) ¹⁵
Agrícola-Soja con distintas rotaciones y secuencias trigo, maíz	510 a 541	Molisol (Rafaela, Santa Fe) ¹⁶
Agrícola-Soja-Soja	346	Molisol (Oliveros, Pcia. de Santa Fe) ¹⁷
Agrícola-Soja	38 a 105	No específica. Pergamino (Pcia. Bs. As.) ¹⁸

Agrícola-Soja	27 a 41	No específica. Manfredi (Pcia. Córdoba) ¹⁹
Forestal- Roble	≈1400	Andisol (Pcia. de Chubut) ²⁰
Forestal-Fresno	≈1200	
Forestal-Pino radiata	≈600	
Ganadero-Gramíneas nativas	≈2,8 a 3,8 (μmol p-nitrofenol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Aridisol (Sur pcia. de Bs. As.) ²¹
Agrícola-cultivo de Vid-manejo convencional	≈10 (μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹)	No específica (Pcia. San Juan) ²²
Agrícola-cultivo de Vid-manejo orgánico	≈30 a 32 (μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹)	No específica (Pcia. San Juan) ²³

¹ Toledo, Dalurzo y Vazquez (2010). ² Toledo, Dalurzo y Vazquez (2010). ³ Dalurzo, Toledo y Vazquez (2005). ⁴ Arzuaga *et al.* (2005). ⁵ Arzuaga *et al.* (2005). ⁶ Arzuaga *et al.* (2007). ⁷ Toledo *et al.* (2015). ⁸ Arzuaga (2016). ⁹ Arzuaga (2016). ¹⁰ Toledo (2014). ¹¹ Effron *et al.* (2006). ¹² Effron *et al.* (2006). ¹³ Effron *et al.* (2006). ¹⁴ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁵ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁶ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁷ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁸ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ¹⁹ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ²⁰ Effron *et al.* (2012). ²¹ Ambrosino *et al.* (2020). ²² Medina (2018). ²³ Medina (2018).

Tabla N° 4. Valores medios de la actividad de la fosfatasa alcalina (APAL) obtenidos en superficie para suelos de Argentina al aplicar PNP como sustrato enzimático

Uso	APAL	Orden de suelo y procedencia
Agrícola-Soja	5,7 - 13,8 mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹	No específica. Pergamino (Bs. As.) ¹
Agrícola-Soja	8,2 - 15,5 mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹	No específica. Manfredi (Córdoba) ²
Ganadero-Gramíneas perennes nativas	≈1,5 a 1,9 μmol p-nitrofenol.g ⁻¹ .h ⁻¹	Aridisol ³
Agrícola-cultivo de Vid-manejo convencional	≈25 μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹	No específica. Dpto. San Martín (Pcia. San Juan) ⁴

≈: aproximado sobre la base de gráficos visualizados en los trabajos originales publicados.

¹ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ² Fernández, Sagardoy y Gómez (2008).

³ Ambrosino *et al.* (2020). ⁴ Medina (2018). ⁵ Medina (2018).

En resumen. Las enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas son importantes indicadores de la calidad biológica. Es menester respetar los protocolos definidos para su determinación y los resultados deben ser interpretados con precaución, teniendo en cuenta la evaluación de otros atributos de la calidad del suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSINO, M.L., Lucero, C.T., Pagliero, F.E., Lorda, G.S., Ithurrart, L.S., Torres, Y.A., Blázquez, F.R. *et al.* (2020, octubre 13-16). Actividad enzimática celulosa y fosfatasa del suelo luego de una quema controlada en un pastizal semiárido [Actas]. *XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. «Suelos: desafíos para una producción y desarrollo sustentables»*. Corrientes, Corrientes, Argentina, pp. 333-338.
- ARZUAGA, S.A., Fernández López, C., Dalurzo, H.C. y Vazquez, S. (2005). «Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida». En *Entisoles, alfisoles y vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas*. Corrientes: Comunicaciones científicas y tecnológicas, Secretaría General de Ciencia y Técnica, Unne.
- ARZUAGA, S.A., Morales, L.A., Prause, J. y Toledo, D.M. (2007, agosto 3-6). «Fósforo asimilable y fosfatasas ácidas en suelos forestados con Quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae engler*) en la provincia del Chaco» [Actas]. *XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la Facultad de Ciencias Agrarias-Unne*. Corrientes.
- ARZUAGA, S.A., Toledo, D.M., Contreras Leiva, S.M., Lamón, F. y Vazquez, S. (2016). «Efecto de sustitución de la selva por forestaciones y cultivos agrícolas sobre la actividad enzimática» [Actas]. *XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo*. Río Cuarto, Córdoba. Disponible en <https://bit.ly/3ttQzOg>
- BALIGAR, V.C., Wright, R.J. y Smedley, M.D. (1988). «Acid phosphatase activity in soil of the Appalachian Region». *Soil Science Society of American Journal*, 52, 1612-1616.
- BECK, M.A. y Sánchez, P.A. (1994). «Soil phosphorus fraction dynamics during 18 years of cultivation on a Typic Paleudult». *Soil Science Society of American Journal*, 58, 1424-1431.
- BOSCHETTI, N.G., Valenti, R., Vesco, C. y Sione, M. (2000). «Contenido de fósforo total en suelos con características vérticas de la provincia de Entre Ríos». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20, 53-58.

- BROWMAN, M.G. y Tabatabai, M.A. (1978). «Phosphodiesterase activity of soils». *Soil Science Society of American Journal*, 42, 284-290.
- DALURZO, H.C. (2002). *Agregado de residuos orgánicos en suelos ferralíticos. Efecto sobre variables que estiman sustentabilidad*. Tesis Magister Scientiae. Buenos Aires: Escuela para Graduados Alberto Soriano, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- DALURZO, H.C., Toledo D.M. y Vazquez, S. (2005). «Parámetros químicos y biológicos en Oxisoles con uso cítrico». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 23(2), 159-165.
- DALURZO, H.C., Vazquez, S. y Toledo, D.M. (2006). «Calidad de suelos en agroecosistemas de Misiones». En Paz González, A. (ed.) *Bases para la conservación de suelos y aguas en la Cuenca del río Paraná* (pp. 109-117). España: Xunta de Galicia.
- DE LA ROSA, D. (2008). *Evaluación agro-ecológica de los suelos para un desarrollo rural sostenible*. Buenos Aires: Mundi-prensa.
- DÍAZ, n.A., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A. y Jorrín Novo, J. et al. (2010). *Espectrofotometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba, España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Disponible en <https://bit.ly/3uiMWKj>
- DICK, R.P., Breakwell, D.P. y Turco, R.F. (1996). «Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Methods for Assessing Soil Quality*. Vol. 49. Cap. 15. Especial publication. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- DIEZ, A., Zamuner, E., Picone, L. y Berardo, A. (2000). «Efecto de la aplicación de dosis única o fraccionada de fertilizante fosfatado sobre el fósforo del suelo» [Actas]. *XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. AACs. Mar del Plata, Buenos Aires.
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assessing soil quality». En Doran, J.W. et al. (eds.) *Defining soil quality for sustainable environment* (pp. 3-21). Spec. Publ. 35. Madison. Wisconsin: Soil Science Society of America y ASA.
- DORAN, J.W. y Jones, A. (1996). *Methods for assessing soil quality*. SSSA Special Publ. 49. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- EIVAZI, F. y Tabatabai, M.A. (1977). «Phosphatases in soils». *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 9, Issue 3, 167-172.
- EFFRON, D.N., Jimenez, M.P., Defrieri, R.L. y Prause, J. (2006). «Relación de la actividad de fosfatasa ácida con especies forestales dominantes y con algunas propiedades del suelo de un bosque argentino». *Información Tecnológica*, 17(1), 3-7.
- EFFRON, D.N., Sarti, G.C., Quinteros, M.C. y Catán, S.I. (2012). «Influencia de Especies Arbóreas Implantadas sobre Parámetros Biológicos y

- Bioquímicos en un Suelo Forestal de Chubut, Argentina». *Información Tecnológica*, 23(2), 87-92.
- FERNÁNDEZ, L.A., Sagardoy, M.A. y Gómez, M.A. (2008). «Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana Norte del área sojera argentina». *Revista Ciencia del suelo*, 26(1), 35-40.
- FERRERAS, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V. y Beltrán, C. (2009). «Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 27, 103-114.
- GALANTINI, J.A. y Suñer, L. (2008). «Las fracciones orgánicas del suelo: análisis en los suelos de la Argentina». *Agriscientia*, XXV, 41-55.
- GALVIS-SPINOLA, A. y Hernández-Mendoza, T. (2004). «Cálculo del nitrógeno potencialmente mineralizable». *Interciencia*, 29, 377-383.
- GIUFFRÉ, L., Romaniuk, R., Conti, M.E. y Bartoloni, N. (2006). «Multivariate evaluation of no-tillage system quality indicators in Argiudolls of Rolling Pampa (Argentina)». *Biology and Fertility Soils*, 42, 556-560.
- HALM, B.J, Stewart, J.W.B. y Halstead, R.L. (1972). «The phosphorus cycle in a native grassland ecosystem». En *Isotopes and radiation in soil-plant relationships including forestry* (pp. 571-586). Vienna: Int. Atomic Energy Agency, SM 151/7.
- HENRÍQUEZ, C., Uribe L., Valenciano, A. y Nogales, R. (2014). «Actividad enzimática del suelo -Deshidrogenasa, -glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos». *Agronomía Costarricense*, 38(1), 43-54. Disponible en www.cia.ucr.ac.cr
- JACKSON, M.L. (1964). *Análisis químico de suelos*. Barcelona: Ediciones Omega.
- KARLEN, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F. y Schuman, G.E. (1997). «Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation». *Soil Science Society of American Journal*, 61, 4-10.
- KISS, S., Dracan-Bularda, M. y Radulescu, D. (1975). «Biological significance of enzymes accumulated in soil». *Advances in Agronomy*, 27, 25-87.
- LARSON, W.E. y Pierce, F.J. (1991). *Conservation and enhancement of soil quality*. In *Evaluation of sustainable management in the developing world*. Vol 2 (pp. 175-203). IBSRAM Proc. 121 (2). Bangkok, Tailandia: Int. Board for soil Res. and Management.
- LEIRÓS, M.C., Trasar-Cepeda, C., García-Fernández, F. y Gil-Sotres, F. (1999). «Defining the validity of a biochemical index of soil quality». *Biology and Fertility of Soils*, 30, 140-146.
- MAROKO, J.B., Buresh, R.J. y Smithson, P.C. (1999). «Soil phosphorus fractions in unfertilized fallow-maize systems on two tropical soils». *Science Society of American Journal*, 63, 320-326.
- MEDINA, E.M. (2018). *Efectos de los diferentes manejos agronómicos sobre indicadores bioquímicos y microbiológicos de calidad de suelos*

- de viñedos. Tesis Doctoral. San Juan: Universidad Nacional de San Juan. Disponible en <https://bit.ly/3NactoW>
- MIJANGOS, I., Pérez, R., Albizu, I. y Garbisu, C. (2006). «Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters». *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 100-106.
- NAHAS, E. (2002). «Microorganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas». *Bragantia, Campinas*, 61, 267-275.
- NANNIPIERI, P., Giagnoni, L., Landi, L. y Renella G. (2011). «Role of Phosphatase Enzymes in Soil». Cap. 9. En Bunemann, E.K. *et al.* (eds.) *Phosphorus in Action, Soil Biology* (pp. 215-243). Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Organización de las Naciones Unidas (2019). *Una población en crecimiento*. Disponible en <https://bit.ly/3qrt6eO>
- PASCALÉ, C., Heredia, O. y Giuffré, L. (2000). «Distintas fracciones de P en suelos de Entre Ríos». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20, 59-62.
- PELLEGRINI, A.E. (2017). *Macronutriente del suelo: Fósforo*. La Plata: UNLP.
- PICONE, L.I. y Zamuner, E. (2002). «Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica». *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 16.
- PICONE, L.I., Zamuner, E.C., Berardo, A. y Marino, M.A. (2003). «Phosphorus transformations as affected by sampling date, fertilizer rate, and phosphorus uptake in a soil under pasture». *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 67, 225-32.
- ROJAS, J.M. (2012). *Indicadores de calidad de suelos desmontados y destinados a la producción agrícola en el área piloto de la Ecorregión chaqueña*. Maestría en Ciencias Agrarias, Orientación: Producción Sustentable. Tucumán: Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán.
- SPEIR, T.W. y Ross, D.J. (1978). «Soil phosphatase and sulphatase». En Burnes, R.G. (ed). *Soil Enzymes* (pp: 197-250). Nueva York: Academic Press.
- TABATABAI, M.A. y Dick, W.A. (1979). «Distribution and stability of phosphatase in soil». *Soil Biology and Biochemistry*, 11, 655-659.
- TABATABAI, M.A. (1982). «Soil enzymes». En Page, A.L., Miller, R.H. y Keeney, D.R. (eds.) *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties (2a ed., pp. 903-927). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- _____ (1994). «Soil Enzymes». En Soil Science Society of America (ed.) *Methods of Soil Analysis*. Parte 2. Microbiological and Biochemical Properties (pp. 775-833). Book series N° 5).
- TRASAR, C., Gil, F. y Leirós, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid: Mundi-prensa.

- TOLEDO, D.M., Dalurzo, H.C y Vazquez, S. (2007, septiembre 17-21). «Efecto del uso tabacalero sobre el fósforo total en Oxisoles de la República Argentina» [Actas 276]. *XVII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. León Guanajuato, México.
- _____. (2010). «Fosfatasa ácida en Oxisoles bajo cultivo de tabaco». *Revista de la Ciencia del Suelo de la Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo*, 28(1), 33-38.
- TOLEDO, D.M. (2014, septiembre). *Calidad de suelo en Agro-ecosistemas de Misiones: Desarrollo y validación de Índices de calidad. Su aplicación en la evaluación del cambio en el uso de las tierras*. Tesis para acceder a Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el área de Recursos Naturales. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste septiembre.
- TOLEDO, D.M., Arzuaga, S.A., Contreras Lieva, S.M. y Vazquez, S. (2015). «Biological indicators of soil quality in natural and cultivated subtropical systems». *Journal of Advances in Agriculture*, 4(2).
- TRASAR-CEPEDA, C., Leirós, C., Gil-Sotres, F. y Seoane, S. (1998). «Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties». *Biology and Fertility of Soils*, 26, 100-106.
- VAZQUEZ, S., Dalurzo, H. y De Lifschitz, A.P. (1998). «Distribución del fósforo total y orgánico en Alfisoles, Ultisoles y Oxisoles del sur de Misiones (Argentina)». *Ciencia del Suelo*, 16, 47-49.
- VIDELA, C. y Picone, L. (2017). «Indicadores biológicos de calidad de suelo». En Wilson, M.G. et al. (eds.) *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina* (1a ed.) Entre Ríos: Ediciones Inta.
- VILLAMIL, M.B., Miguez, F.E. y Bollero, G.A. (2008). «Multivariate Analysis and Visualization of Soil Quality Data for No-Till Systems». *Journal of Environmental Quality*, 37, 2063-2069.
- WANDER, M.M. y Bollero, G.A. (1999). «Soil Quality Assessment of Tillage Impacts in Illinois». *Science Society of American Journal*, 63, 961-971.
- YOSHIOKA, I.C., Sánchez de Prager, M. y Bolaños, M.M. (2006). *Actividad de fosfatasas ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo*. Artículo derivado de la Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en suelos. Colombia: UNAL. Disponible en <https://bit.ly/3its1ig>
- ZORNOZA, R., Acosta, J., Bastida, F., Domínguez, S.G., Toledo, D.M. y Faz, A. (2015). «Identification of Sensitive Indicators to Assess the Interrelationship between Soil Quality, Management Practices and Human Health». *Soil*, 1, 173-185. Göttingen: Copernicus Editorial-European Geosciences Union.