



**EFFECTO DE UN PERÍODO DE EXTREMA SEQUÍA SOBRE LAS PROPIEDADES
BIOQUÍMICAS DE PASTIZALES MEDITERRANEOS EN EL TÉRMINO
MUNICIPAL DE LAS ROZAS, COMUNIDAD DE MADRID.**

Máster Universitario en Restauración de Ecosistemas

Presentado por:

Fabián Valbuena Mora

Directores:

Dr. Miguel Ángel Casermeiro Martínez

Codirectora:

Dra. María Teresa de la Cruz Caravaca

En Madrid, a 28 de Junio de 2019

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad docente de Edafología del departamento de química en la facultad de ciencias farmacéuticas de la Universidad Complutense de Madrid, en especial a los directores del presente trabajo de fin de master, el doctor Miguel Ángel Casermeiro Ramírez y la doctora María Teresa de la Cruz Caravaca, por el compromiso, dedicación y entrega.

De igual manera mis agradecimientos para la fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, quien nos brindó la posibilidad de realizar la investigación en la Finca Monte de Paris.

RESUMEN:

Los constantes cambios en las condiciones ambientales, debido al cambio climático han generado problemas importantes en el funcionamiento del suelo, principalmente en las propiedades físicas, químicas y biológicas. La presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar el impacto de un periodo extraordinario de sequía sobre el funcionamiento bioquímico en suelos de pastizales mediterráneos, mediante un modelo experimental de incubaciones en laboratorio, que permite comparar escenarios a diferente humedad y temperatura. Se eligieron cinco parcelas atendiendo a la composición florística de los pastizales y se recogieron muestras de la capa superficial del suelo. Como resultado de los análisis se concluye que se trata de suelos arenosos ligeramente ácidos, con valores promedio bajos de carbono orgánico, que oscilan entre 0,1% y 1,5%. La humedad tiene un rol importante en la actividad enzimática, la respiración del suelo y en la biomasa microbiana. Después del periodo prolongado de sequía, la actividad microbiológica se ve limitada, sin embargo se observa un incremento asociado a las precipitaciones ocurridas en la zona. Finalmente se pone de manifiesto en el análisis estadístico una relación importante entre la temperatura y la humedad.

Palabras claves: Actividad enzimática, respiración del suelo, cambio climático, humedad, biomasa microbiana.

ABSTRACT:

The constant changes in environmental conditions due to climate change have generated significant problems in the functioning of the soil, mainly in physical, chemical and biological properties. The main objective of the present research was to evaluate the impact of a period of extraordinary drought on biochemical functioning of Mediterranean pastures soils, based on an experimental model of laboratory incubations, which allows to compare scenarios at different humidity and temperature. Five plots were selected according to the floristic composition of the pastures and samples of the topsoil were collected. As a result of the analyzes, it is concluded that these are lightly acid sandy soils, with low average values of organic carbon, ranging between 0.1% and 1.5%. Humidity plays an important role in enzymatic activity, soil respiration and microbial biomass. After the prolonged period of drought, the microbiological activity is limited, however there is an increase associated with the rainfall that occurred in the area. Finally, an important relationship between temperature and humidity is revealed in the statistical analysis.

Keywords: Enzymatic activity, soil respiration, climate change, humidity, microbial biomass.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| 1) Introducción | 9 |
| 1.1) Antecedentes | 10 |
| 1.2) Respiración del suelo | 12 |
| 1.3) Biomasa microbiana | 13 |
| 1.4) Actividad enzimática | 14 |
| 2) Objetivos | 15 |
| 2.1) Objetivo General | 15 |
| 2.2) Objetivos Específicos | 15 |
| 3) Materiales y Métodos | 15 |
| 3.1) Área de estudio | 15 |
| 3.1.1) Climatología | 16 |
| 3.2) Diseño experimental | 18 |
| 3.3) Selección y toma de muestras | 18 |
| 3.4) Determinación de la composición florística del área de estudio..... | 20 |
| 3.5) Análisis de las muestras | 20 |
| 3.5.1) Respiración de suelo | 21 |
| 3.5.2) Humedad del suelo | 21 |
| 3.5.3) Carbono orgánico | 22 |
| 3.5.4) pH Agua - KCl..... | 22 |
| 3.5.5) Textura | 23 |
| 3.5.6) Biomasa microbiana..... | 24 |
| 3.5.7) Actividad enzimática | 24 |
| 3.5.7.1) Actividad Catalasa y Polifenol Oxidasa | 24 |
| 3.5.7.2) Actividad Glucosidasa | 25 |
| 3.5.7.3) Actividad Ureasa | 25 |
| 3.5.7.4) Actividad fosfatasa | 25 |
| 4) Análisis Estadísticos | 26 |
| 5) Resultados | 26 |
| 5.1) Composición florística del área de estudio..... | 26 |
| 5.2) Características de los suelos..... | 27 |
| 5.2.1) Textura | 27 |
| 5.2.2) pH | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.3) Carbono orgánico | 28 |
| 5.3) Respiración | 29 |
| 5.4) Biomasa microbiana | 29 |
| 5.5) Actividad enzimática | 30 |
| 5.5.1) Actividad enzimática catalasa | 30 |
| 5.5.2) Actividad enzimática glucosidasa | 31 |
| 5.5.3) Actividad enzimática ureasa | 33 |
| 5.5.4) Actividad enzimática fosfatasa | 34 |
| 5.5.5) Actividad enzimática polifenol oxidasa | 35 |
| 5.6 Análisis estadísticos de la actividad enzimática | 36 |
| 6) Discusión | 37 |
| 7) Conclusiones | 41 |
| 8) Bibliografía | 43 |

1) INTRODUCCIÓN

La variabilidad en las condiciones ambientales, generado principalmente por el cambio climático, suponen uno de los problemas más importantes en el funcionamiento de los suelos, ya que, las propiedades físicas, químicas y biológicas se ven modificadas, generando cambios sustanciales sobre los procesos que se llevan a cabo en este, dificultando a su vez los procesos de restauración, debido principalmente a que el suelo es una entidad dinámica con multitud de procesos biológicos y geoquímicos, los cuales muestran una elevada heterogeneidad espacial y temporal, y con mecanismos de control que también varían constantemente (Ochoa et al, 2007). Así mismo, las propiedades biológicas y la actividad enzimática, son parámetros útiles como indicadores de funcionamiento y calidad del suelo, ya que son muy sensibles a las condiciones ambientales. El conocimiento de cómo se ve afectada dicha actividad puede ser utilizado para los procesos de restauración del suelo.

No obstante, existen diversos parámetros considerados claves para determinar la calidad del suelo y entender a su vez su funcionamiento. Aquellos de naturaleza fisicoquímica (pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono), microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana, diversas actividades enzimáticas). Una buena actividad microbiana supone condiciones fisicoquímicas y ambientales óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de los microorganismos (bacterias, hongos, algas, actinomicetos) debido a que intervienen en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos y además en la formación de la estructura de los suelos (Ramos et al, 2008). Las bacterias y los hongos sintetizan y secretan enzimas tales como fosfatasas, proteasas, ureasas, que pasan a formar parte de la matriz del suelo. Debido a su naturaleza proteica, las enzimas se ven afectadas por factores ambientales como la temperatura y la humedad, y factores físico-químicos como el pH. Las enzimas intervienen en la mayoría de los procesos que tiene lugar en el suelo, siendo responsables de la formación de moléculas orgánicas y concretamente tienen una participación importante en los ciclos del nitrógeno, fósforo y carbono. A su vez cumplen un rol participativo en procesos como la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica de nitrógeno, entre otros (Caldwell, 2005, Carpa, 2009).

Las principales enzimas se pueden clasificar en oxidoreductasas como por ejemplo la

catalasa, glucosa oxidasa, deshidrogenasa y peroxidasa, las transferasas como la transaminasa y las hidrolasas como la celulasa, lipasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa (Paul y Clark 2007). Las enzimas deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa se han utilizado como indicadores para evaluar el efecto del manejo agronómico sobre características de calidad o estado de salud del suelo; estas enzimas participan en los ciclos de C, N, y P, elementos importantes en la nutrición de las plantas. La actividad de la deshidrogenasa permite, de manera global, tener una idea de los procesos microbianos que ocurren en el suelo debido a que se encuentran presentes únicamente en sistemas vivos, que indican además, la tasa de oxidación de la materia orgánica. De las enzimas involucradas en el ciclo del C, la β -glucosidasa ha sido la más ampliamente utilizada en la evaluación de la calidad de suelos sujetos a diferentes procedimientos de manejo; la enzima ureasa por otro lado cataliza la conversión de la urea a amonio y la fosfatasa está involucrada en el ciclo de P (Gajda et al, 2005, Balezentienè et al, 2009).

La importancia del trabajo radica principalmente en contribuir al conocimiento del funcionamiento del suelo a través del análisis de las principales enzimas ya que, al estar afectadas por la variabilidad en las condiciones ambientales son muy sensibles al cambio climático y pueden emplearse como indicadores de la salud del suelo.

1.1) ANTECEDENTES

Según el International Panel of Climatic Change (IPCC) el termino cambio climático se refiere a cualquier cambio del clima a lo largo del tiempo, ya sea, por condiciones naturales o como resultados de acciones antrópicas. Sin embargo, este concepto difiere del utilizado en la Convención Marco sobre el cambio Climático (CMCC) que describe el cambio climático como un cambio en el clima, que esta directa o indirectamente relacionado con la actividad humana (Karmakar et al. 2016).

El impacto del cambio climático sobre los suelos es notorio, principalmente por cambios en la temperatura, lo cual afecta la descomposición de la materia orgánica y por cambios en la humedad, obstaculizando así los procesos biológicos y geoquímicos que se llevan a cabo en el suelo (Karmakar et al. 2016).

La respiración del suelo también puede verse afectada. A escala global, la respiración del suelo está controlada principalmente por la temperatura y la precipitación (Dacal et al 2019). Estudios realizados por Sabaté et al, 2002 y Peñuelas et al, 2005, predicen el aumento del calentamiento y la sequía en las próximas décadas en la cuenca mediterránea, lo cual podría alterar fuertemente los flujos de CO₂ de los suelos (Collins Houghton et al, 2013). No obstante, a partir de otras investigaciones se ha obtenido evidencias que existen factores bióticos y abióticos que influyen sobre la respiración del suelo, tales como: contenido de agua en el suelo, cantidad de materia orgánica del suelo, biomasa microbiana, acidez del suelo, textura del suelo, entre otros, lo cual corrobora la condición de que el fenómeno de cambio climático afectaría considerablemente el funcionamiento del suelo ya que, cada uno de las propiedades mencionadas anteriormente están estrictamente relacionadas con la cantidad de agua y la temperatura.

Así mismo, se espera un aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂) y metano, y por tanto un aumento en la temperatura global y un ciclo hidrológico más intenso, provocando sequías más fuertes e inundaciones más graves (Collins Houghton et al, 2013). Estudios históricos ya muestran un aumento en el CO₂ atmosférico, en las temperaturas globales y en el patrón de precipitación (Zeppel et al, 2014). La precipitación ha comenzado a mostrar una tendencia al cambio, precipitaciones intensas y extremas, seguidas de periodos largos de sequía se han observado en los últimos años y se prevé que los cambios persistan en el futuro (Zeppel et al, 2014). A raíz de esta variabilidad en los patrones ambientales, algunos estudios indican cambios significativos en los procesos del suelo, como la mineralización de nitrógeno y del carbono debido entre otros a una disminución en la biomasa microbiana y por consiguiente una actividad enzimática con tendencia a la baja, además de cambios en la disponibilidad de nutrientes. Rustad et al 2001 indican que el calentamiento global incrementará un 20% la respiración media del suelo debido a la variabilidad de la humedad del suelo, esto sin lugar a dudas produciría importantes implicaciones sobre el correcto funcionamiento del ecosistema.

Por otro lado, respecto a los procesos bioquímicos, el régimen térmico e hídrico son los factores claves responsables de este funcionamiento (Giacometti et al. 2013). El contenido de agua en el suelo afecta el estado fisiológico de los microorganismos y plantas (Walker et al. 2003), (Kyaw.A et al. 2017). En verano, la respiración y las fluctuaciones de agua son mayor en suelos húmedos que en secos. Suelos suficientemente húmedos mantienen comunidades

microbiana más funcionales, sin embargo, un exceso en la humedad puede conducir a una menor biomasa microbiana (Silva et al. 2008, Unger et al. 2009), principalmente debido a la formación de oxígeno, el cual es desfavorable para algunos microorganismos (Unger et al. 2009). No obstante, la sequía también puede perturbar las propiedades del suelo y por consiguiente los procesos microbiológicos que allí se llevan a cabo (Kim et al. 2008). Adicionalmente, el agua es un requisito fundamental en la actividad enzimática (Jiang y Zhang 2002) por tanto es importante conocer los efectos directos del calentamiento global sobre la actividad de las enzimas en el suelo relacionadas con la mineralización del carbono y el nitrógeno. Algunos estudios han revelado resultados importantes, demostrando que la sequía puede disminuir la actividad de la ureasa, la proteasa y la β -glucosidasa (Sardañes y Peñuelas. 2004).

1.2) RESPIRACIÓN DEL SUELO

La respiración del suelo es el CO₂ producido por la actividad biológica de los organismos presentes en el, donde se incluyen las raíces de las plantas, los animales y los microorganismos. La respiración del suelo que generalmente se mide como un flujo de CO₂ de la superficie del suelo, es una medida de la actividad metabólica del mismo. El dióxido de carbono generado se almacena en el espacio poroso y se va liberando desde la superficie del suelo hacia la atmosfera mediante un proceso de difusión entre zonas del suelo con diferente concentración. (Phillips et al, 2015). Su importancia radica, en que puede ser un indicador de la capacidad del suelo para sustentar la vida que se llevan a cabo en el mismo, incluyendo los cultivos, los animales y los microorganismos. A su vez describe el nivel de actividad microbiana, el contenido de materia orgánica y su descomposición (Phillips et al, 2015). Sin embargo este proceso de descomposición de la materia orgánica está controlado por una serie de factores como: las condiciones climáticas del suelo (humedad y temperatura), propiedades del suelo o alteraciones en el mismo, entre otros (Dacal et al, 2019).

La temperatura del suelo es uno de los factores que tienen mayor importancia sobre el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, de esta forma a medida que se eleva la temperatura se aceleran las reacciones químicas y enzimáticas, por lo que el crecimiento y el metabolismo de la biomasa serán más rápidos. Por lo tanto un aumento de la temperatura del suelo incrementa la tasa de mineralización causando un descenso de las reservas de carbono

orgánico (Davidson et al, 1998, Leiros et al. 1998, Rey et al. 2002). Por su parte el contenido de agua en el suelo también es una variable importante en la descomposición de la materia orgánica y la formación de gases por efecto invernadero. La sequía del suelo limita la actividad fisiológica de los microorganismos y la difusión de nutrientes en el espacio poroso del suelo (Dacal et al, 2019). De forma general se puede indicar que la actividad metabólica tiende a disminuir mientras el suelo se encuentre seco, mas exactamente por debajo de un determinado límite. No obstante, si hay un exceso de agua, la actividad metabólica también desciende debido a la sustitución de las poblaciones aeróbicas por anaeróbicos facultativos/obligados y a la limitación de la difusión del oxígeno.

En general la acumulación de carbono es mayor en suelos húmedos ya que la descomposición está restringida por altos valores de humedad, así, tanto los organismos descomponedores como las plantas son más productivos bajo condiciones de humedad intermedias, donde cuentan con la disponibilidad suficiente de oxígeno. Por su parte en zonas áridas, la actividad microbiana esta frecuentemente limitada por la humedad, por lo que la tasa de mineralización está ligada a las épocas de precipitación (Austinet al, 2004), y a su vez las sequias periódicas resultan en biomasa muerta que sirve como reservorio y dejan disponibles nutrientes para las plantas u otros organismos (Whitford, 2002).

1.3) BIOMASA MICROBIANA

La biomasa microbiana define el componente funcional de la microbiota del suelo, responsable principalmente de la descomposición y reconversión de la materia orgánica y la transformación de nutrientes, constituyendo el componente vivo de la materia orgánica del suelo, excluyendo las raíces de las plantas y representa la fracción lábil, y por lo tanto responde rápidamente al efecto de perturbación o recuperación del suelo (Ross & al., 2001). Los microorganismos tienen un rol importante en el desarrollo y conservación del suelo; Y a pesar que representa una pequeña parte de la materia orgánica del suelo, la biomasa microbiana participa activamente en la descomposición de la materia orgánica muerta que ingresa al suelo en forma de hojarasca o restos de animales o plantas, y a su vez es una fuente de nutrientes (N, P y S) para las plantas. Por lo cual, ha sido relacionada con los procesos de mineralización de la materia orgánica (Shi et al. 2006). Por su parte los cambios en la materia orgánica del suelo son muy lentos y se requiere de muchos años para medir los cambios resultantes de la

perturbación. Sin embargo, existen evidencias de que las propiedades biológicas pueden ser indicadores potencialmente sensibles al estrés ecológico o a la restauración de los ecosistemas (Solly et al, 2017., Hartmann et al, 2017). Es así como la cantidad de biomasa microbiana del suelo y los cambios estacionales sufridos por ella, van a estar influidos por la cantidad de materia orgánica del suelo, por factores climáticos (temperatura y humedad), uso de la tierra y por las características fisicoquímicas del suelo (Chengjie et al, 2018). Lo cual lo convierte en un indicador altamente sensible de los cambios sucedidos en el suelo, siendo por ello utilizada para predecir cambios en la materia orgánica por distintas prácticas en el suelo (Chengjie et al, 2018).

1.4) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Además de la actividad microbiana del suelo, la actividad enzimática tiene un rol importante en la degradación de compuestos contaminantes como parte del ecosistema biológico edáfico. Respecto a su clasificación según su origen-estado en el suelo, las enzimas pueden ser extracelulares, las cuales son liberadas durante el metabolismo y muerte celular, o intracelulares que hacen parte de la biomasa microbiana o bien están absorbidas en la materia orgánica (Paul et al, 2007). Las enzimas liberadas al medio ambiente pueden difundirse más lejos al no estar vinculadas a la célula, lo que permite una mayor movilidad y por tanto pueden alcanzar más fácilmente compuestos inmovilizados en el suelo y degradarlos. Esta actividad enzimática depende principalmente de la composición de la comunidad de microorganismos (bacterias y hongos) presentes en el suelo y de la naturaleza del mismo (Gianfreda & Rao, 2008).

Su importancia trasciende principalmente porque intervienen en la mayoría de los procesos que tienen lugar en el suelo y las funciones que realizan son de gran importancia. Son responsables de la transformación de compuestos orgánicos complejos a sustancias asimilables por las plantas, por lo tanto, son fundamentales para comprender el funcionamiento de un ecosistema, ya que determinan los distintos ciclos de los nutrientes en el suelo, particularmente, tienen participación vital en el ciclo del nitrógeno, fósforo y carbono y a su vez son partícipes en procesos como, la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica del nitrógeno, entre otros (Caldwell, 2005, Carpa, 2009, Shonkor et al, 2010).

1) OBJETIVOS

2.1) OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de un periodo extraordinario de sequía sobre la actividad enzimática de suelos de pastizales mediterráneos.

2.2) OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la composición florística de las 5 parcelas escogidas en el estudio.
- Determinar las características fisicoquímicas del suelo (pH, materia orgánica y textura) en las parcelas seleccionadas para el estudio.
- Determinar la respiración del suelo y su relación con la biomasa microbiana.
- Diseñar un modelo experimental que permita comprobar cómo afecta la humedad y la temperatura a la actividad enzimática.
- Evaluar la actividad enzimática del suelo en los pastizales seleccionados y comparar los resultados con los obtenidos en el modelo experimental.

3) MATERIALES Y METODOS

3.1) ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra ubicado en el término municipal de las Rozas, perteneciente a la comunidad de Madrid (Figura 1). El estudio se realizó en pastizales mediterráneos de la Finca Monte de Paris de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, cuyas coordenadas son 40° 28'47.85 N y 3° 50'46.90 W.

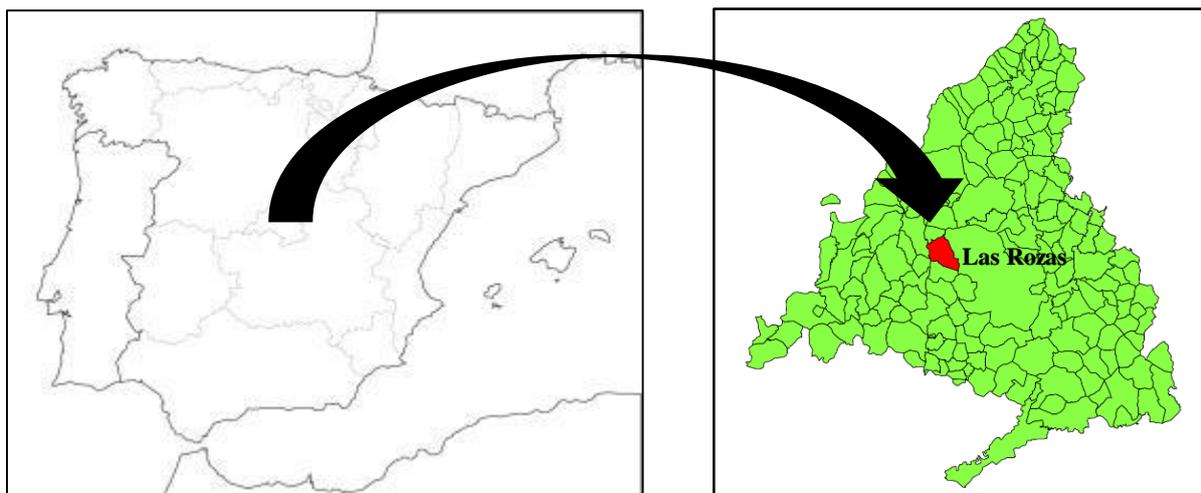
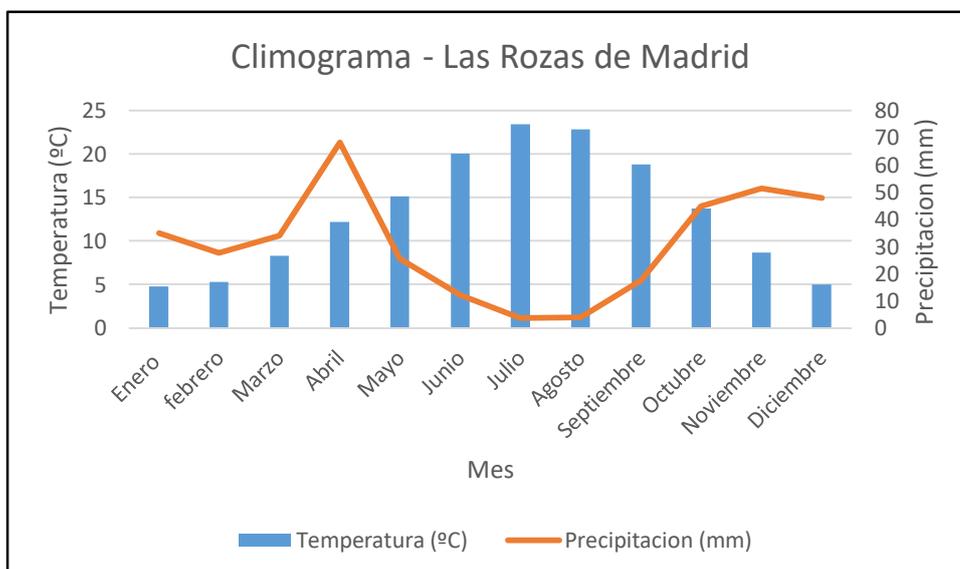


Figura 1. Área de estudio.

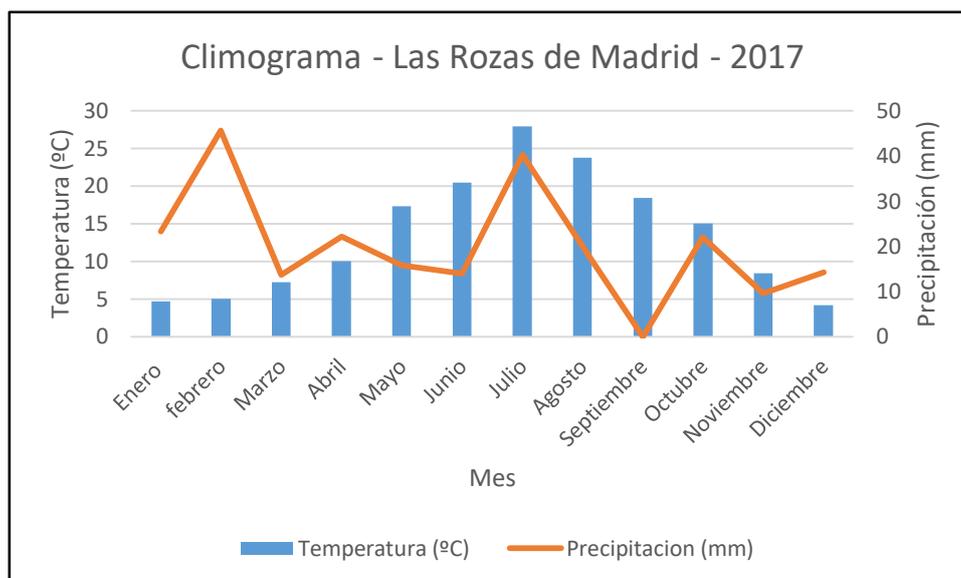
3.1.1) CLIMATOLOGÍA

La temperatura media anual en las Rozas de Madrid está cercana a los 13°C, variando desde los -5°C en los meses más fríos, hasta cerca de los 40°C en algunos casos. El periodo de heladas seguras comprende desde finales del mes de noviembre hasta finales del mes de marzo, registrando entre 40 y 90 días con temperaturas inferiores a 0°C. En líneas generales se puede considerar que el clima dominante en la zona corresponde a un clima mediterráneo continental, que permite inviernos fríos y veranos suaves. Las precipitaciones, que alcanzan una media anual de 547mm, se concentran principalmente en otoño e inviernos, con un marcado periodo de aridez durante el verano.

A



B



Grafica 1. A Climograma de los últimos 30 años de Las Rozas de Madrid. B. Climograma año 2017 de Las Rozas de Madrid (Fuente: Aemet).

Tabla 1. Comparación de la precipitación media mensual de los últimos 30 años y el año 2017 en Las Rozas de Madrid.

| Mes | Precipitación (mm) Promedio últimos 30 años | Precipitación año 2017 |
|-----------------------|--|------------------------|
| Enero | 34,9 | 23,3 |
| Febrero | 27,6 | 45,6 |
| Marzo | 33,8 | 13,6 |
| Abril | 68,2 | 22,1 |
| Mayo | 25,4 | 15,8 |
| Junio | 12,11 | 14 |
| Julio | 3,7 | 40,3 |
| Agosto | 3,9 | 20 |
| Septiembre | 17,5 | 0 |
| Octubre | 44,7 | 22 |
| Noviembre | 51,23 | 9,5 |
| Diciembre | 47,9 | 14,3 |
| Promedio Anual | 30,9 | 20 |

Si se comparan los valores de precipitación ocurridos en los últimos 30 años con los

valores de precipitación ocurridos en el año 2017 se observa un notable descenso, que va de 371 mm a 240 mm en 2017, lo que supone una disminución de casi el 40%, lo cual demuestra que hubo un periodo extraordinario de sequía a lo largo de la investigación. Así mismo cabe resaltar que durante el mes de julio se presentó una serie de eventos extraordinarios de precipitaciones con un promedio en el mes de 40,3mm lo cual difiere notablemente con el promedio de los últimos 30 años el cual corresponde a 3,7 mm para el mes de julio. (Gráfica 1, Tabla 1).

3.2) DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de analizar la respuesta de las propiedades fisicoquímicas del suelo frente al periodo de sequía que se presentó durante el año 2017, se realizó un experimento de incubaciones en el laboratorio de la Unidad Docente de Edafología del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas. A partir de la muestra del primer día se tomó una alícuota de cada emplazamiento de 100 g y se depositó en tarros de cristal (mason jar), los cuales fueron incubados de acuerdo a cada tratamiento (Tabla 2). Las condiciones de humedad fueron mantenidas a lo largo del experimento, añadiendo agua cuando fuese necesario, usando un control gravimétrico.

Tabla 2. Diseño experimental de incubaciones

| TRATAMIENTO | TEMPERATURA | HUMEDAD |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| A- Control | Campo | Campo |
| B- Promedio | Media mes curso | Humedad mes promedio |
| C- Promedio + sequía | Media mes curso | 50% humedad mes promedio |
| D- Laboratorio | Laboratorio 20° | Humedad mes promedio |
| E- Laboratorio + Sequia | Laboratorio 20° | 50% Humedad mes promedio |

3.3) SELECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

Para el presente estudio se seleccionaron 5 parcelas a lo largo de la finca monte PARIS (Tabla 3). Se tomaron muestras del horizonte superficial (0-10cm) del suelo, se tamizaron con tamiz de 2mm y se mantuvieron en nevera a 4°C (muestras de campo) durante el tiempo en que se realizaron los análisis de las propiedades bioquímicas. Las muestras fueron tomadas a lo

largo de 5 meses, siendo la primera muestra recogida en noviembre de 2017 (Tabla 4).

Tabla 3. Ubicación de las parcelas

| Parcelas - Coordenadas | Foto Aérea | Foto Terrestre |
|-------------------------------------|---|---|
| 1 - N 40° 29' 0.95 W 3° 51' 1.21 |  |  |
| 2 - N 40° 28' 8.70 W 3° 50' 3.44 |  |  |
| 3 - N 40° 28' 8.33 W 3° 50' 4.12 |  |  |
| 4 - N 40° 28' 8.77 W 3° 50' 7.08 |  |  |

| | | |
|---|---|---|
| <p>5 - N 40° 29' 0.95 W 3° 51' 1.21</p> |  |  |
|---|---|---|

Tabla 4. Cronograma de toma de muestras de los suelos.

| Fecha de muestreo | Muestra |
|-------------------|---------|
| Noviembre 22 | T0 |
| Diciembre 18 | T1 |
| Enero 22 | T2 |
| Febrero 19 | T3 |
| Marzo 20 | T4 |

3.4 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FLORÍSTICA DEL ÁREA DE ESTUDIO.

Con el fin de conocer el estado florístico y la diversidad de especies presentes en el área de estudio, se realizó el conteo de especies en un área de 1m² por cada una de las parcelas, y se determinó la presencia de cada especie identificada en porcentaje por metro cuadrado.

3.5) ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras recogidas entre noviembre de 2017 y marzo de 2018, fueron procesadas en el laboratorio de edafología de la facultad de Farmacia en la universidad Complutense de Madrid. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Respiración del suelo
- Humedad del suelo
- Carbono orgánico

- pH en Agua y en KCl
- Textura
- Biomasa microbiana

Determinación de actividad enzimática de los suelos: Catalasa, β Glucosidasa, Ureasa, Fosfatasa y Polifenoloxidasa.

3.5.1) RESPIRACIÓN DEL SUELO

Las emisiones de CO₂ del suelo fueron medidas en cada uno de los puntos de muestreo por triplicado cada 15 días aproximadamente durante tres meses, siendo la primera toma el 22 de noviembre de 2017 y la última el 20 de marzo de 2018 para un total de 9 medidas (Tabla 3). Estas emisiones fueron tomadas por medio del equipo Li-Cor 8100, un sistema cerrado, que hace circular el aire por una cámara hacia un analizador de gases y luego de vuelta hacia la cámara. El flujo se calcula a partir de la tasa de incremento en la concentración de CO₂ dentro de la cámara (figura 2).

A



B



Figura 2. A. Analizador de gases Licor 8100. B. Punto de muestreo para medida de respiración.

3.5.2) HUMEDAD DEL SUELO

El método de determinación de la humedad utilizado fue el gravimétrico, pesando las muestras antes y después de su secado en la estufa durante 24 horas a 105 °C, y aplicando las medidas sobre la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{A - B}{B - \text{peso capsula}} \times 100$$

3.5.3) CARBONO ORGÁNICO

La determinación de carbono orgánico se realizó por oxidación por vía húmeda según la técnica propuesta por Walkley y Black, que consiste en un método volumétrico de óxido-reducción por retroceso, en el que se oxida la materia orgánica del suelo con un oxidante en exceso (dicromato potásico), y posteriormente se valora el dicromato residual mediante sal de Mohr (Figura 3) (Walkley y Black, 1934).



Figura 3. Determinación carbono orgánico.

3.5.4) pH AGUA – KCl

El pH del suelo se mide potenciométricamente, ya que es independiente del potencial de óxido-reducción, del color del medio, de la turbidez y de las materias coloidales presentes. La técnica se fundamenta en la comparación de la actividad de los iones H⁺ frente a un electrodo de referencia. Dicho electrodo consiste en una membrana de vidrio que contiene una solución de iones H⁺ con una actividad determinada, y que al ser introducida en una solución de pH desconocido desarrolla un potencial eléctrico proporcional a la diferencia de pH entre ambas soluciones. La medición de las muestras se realizó empleando una relación suelo-agua de 1:2.5 (Guitian y Carballas, 1976).

3.5.5) TEXTURA

El análisis granulométrico se realizó según el método de la pipeta de Robinson (Day, 1965) utilizando las muestras previamente sometidas a la eliminación de la materia orgánica con agua oxigenada. El método de la pipeta Robinson se fundamenta en el hecho en que el tiempo de sedimentación de las partículas depende del tamaño de las mismas. El método empleado permite obtener la distribución porcentual de las partículas del suelo según su tamaño, a partir del cual, se puede deducir la textura que presenta el suelo (Tabla 5). La técnica se basa en la separación de fracciones, aceptando la división de la sociedad internacional de la ciencia del suelo, las cuales se clasifican en:

Tabla 5. Clasificación de las fracciones granulométricas del suelo.

| Fracción | Tamaño de la partícula (mm) |
|--------------|-----------------------------|
| Arena gruesa | 2 - 0.2 |
| Arena Fina | 0.2 - 0.02 |
| Limo | 0.02 - 0.002 |
| Arcilla | < 0.002 |



Figura 4. Muestras con agua oxigenada al baño maría para eliminar la materia orgánica y proceder a su posterior análisis granulométrico.

3.5.6) BIOMASA MICROBIANA

La determinación del carbono asociado a la biomasa microbiana se realizó mediante la técnica de fumigación-extracción (Vance et al, 1987). El método se fundamenta en provocar la muerte de la microbiota del suelo, ocasionando la rotura de las membranas celulares mediante la fumigación con cloroformo, con lo cual el contenido citoplasmático de las células microbiana se libera en el suelo. Los compuestos orgánicos liberados por las células de este modo se extraen del suelo empleando K_2SO_4 0,5M. La determinación del carbono asociado a los microorganismos se estima por diferencia con muestras extraídas del mismo modo pero que no han sufrido un tratamiento previo de fumigación con cloroformo.

3.5.7) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Como se ha nombrado anteriormente, las enzimas son los activadores vitales en los procesos que se llevan a cabo en el suelo. A su vez se reconocen como parte importante en el mantenimiento de la salud y en los procesos llevados en él (Shonkor et al, 2010). Con el fin de conocer el estado microbiano del área de estudio, la presencia carbono orgánico en el mismo y la calidad general del suelo se ha determinado evaluar la actividad enzimática de las siguientes enzimas: Catalasa, β -Glucosidasa, ureasa, fosfatasa y polifenol oxidasa.

3.5.7.1) ACTIVIDAD CATALASA Y FENOLOXIDASA

Tanto la enzima catalasa como la fenoloxidasa, son las responsables de la transformación de lignina. Las ligninas son moléculas recalcitrantes de alto peso molecular de origen vegetal que hacen parte de la materia orgánica del suelo. Según algunos autores estas enzimas pueden tener un enorme potencial en el tratamiento de residuos (Duran et al, 2000).

El análisis se llevó a cabo siguiendo la metodología modificada de Pind, la cual tiene como fundamento la adición de sustratos específicos, agua oxigenada para el caso de la peroxidasa y L-Dopa para la fenoloxidasa. Este aminoácido (L-Dopa) con un anillo fenólico se oxida formando una quinona coloreada.

3.5.7.2) ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA

La enzima β -Glucosidasa cataliza la hidrólisis de glucósidos, actuando como enzima limitante de la velocidad en la degradación microbiológica de la celulosa a glucosa. Ha sido encontrada en microorganismos, plantas y animales. A su vez estudios muestran que su actividad está relacionada con el carbono orgánico en el suelo (Tabatabai, 1994). El método seguido en este trabajo para su determinación se fundamenta en los estudios descritos por Tabatabai (1982) y Eivazi & Tabatabai (1988). Consiste en el uso de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido como sustrato, y la determinación espectrofotométrica a 402 nm del p-nitrofenol generado.

3.5.7.3) ACTIVIDAD UREASA

La ureasa es la enzima encargada de catalizar la hidrólisis de la urea a CO_2 y NH_3 con un mecanismo de reacción basado en la formación de un carbamato como intermediario (Tabatai, 1982). Esta enzima se encuentra ampliamente implicada en el ciclo del nitrógeno, y se encuentra distribuida en la naturaleza, participando a su vez en la desaminación de los aminoácidos tras la degradación de las proteínas. Para la determinación de la ureasa se ha tomado como referencia el ensayo desarrollado por Kandelr y Gerber en 1988 y el llevado a cabo por Sinsabaugh et al, en el 2000, en una versión multipocillo.

3.5.7.4) ACTIVIDAD FOSFATASA

Las enzimas fosfatasas, catalizan la hidrólisis de esteres y formas anhidras de H_3PO_4 . Esta enzima desarrolla un papel muy importante en la mineralización del fosforo orgánico y en la nutrición de las plantas, son conocidas además por hidrolizar una variedad de monoésteres fosfóricos (Tabatabai, 1994). Como base para este ensayo se empleó la metodología descrita por Tabatai y Brenner con la modificación posterior introducidas por Nannipieri.

4) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A partir de los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) entre tratamientos, utilizando el programa estadístico SPSS Statistics 25.

5) RESULTADOS

5.1) COMPOSICIÓN FLORÍSTICA DEL ÁREA DE ESTUDIO

A partir de los resultados obtenidos en la determinación de la composición florística se logró identificar 28 especies a lo largo de las 5 parcelas. Cinco de las especies encontradas predominaron en la zona de estudio. Las especies identificadas son: *Xolantha guttata*, *Trifolium arvense*, *Agrostis pourretii*, *Vulpia myuros* y *Hypochaeris glabra* (Tabla 6).

Tabla 6. Composición florística por parcelas en porcentaje por metro cuadrado.

| ESPECIE | PARCELA | | | | |
|------------------------------|---------|---|---|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>Poa bulbosa</i> | 50 | | | 50 | |
| <i>Xolantha guttata</i> | 6 | 1 | | 30 | 2 |
| <i>Hymenocarpos lotoides</i> | | | 2 | | |
| <i>Crepis capillaris</i> | 12 | | | | 6 |
| <i>Tolpis umbellata</i> | 2 | | | 4 | 1 |
| <i>Herniaria hirsuta</i> | 12 | | | 1 | |
| <i>Leontodon longirostri</i> | | 1 | | | |
| <i>Plantago coronopus</i> | 1 | | | | |
| <i>Spergularia purpurea</i> | 6 | | | 1 | 40 |
| <i>Trifolium arvense</i> | 2 | 2 | 3 | 5 | 2 |
| <i>Trifolium glomeratum</i> | 2 | | | 2 | 2 |
| <i>Silene galica</i> | 1 | | | | |
| <i>Agrostis pourretii</i> | 2 | | 2 | 2 | 2 |
| <i>Trifolium cherlieri</i> | 1 | | | | |

| | | | | | |
|------------------------------|---|----|----|----|----|
| <i>Ornithopus compressus</i> | 1 | 3 | 1 | | |
| <i>Hypochaeris glabra</i> | 2 | 2 | | 2 | 1 |
| <i>Malcolmia triloba</i> | | 30 | 60 | | |
| <i>Vulpia myuros</i> | | 50 | 35 | 3 | 4 |
| <i>Evax capetana</i> | | | 20 | 1 | |
| <i>Linaria spartea</i> | | 1 | 10 | 1 | |
| <i>Bromus tectorum</i> | | 1 | | | |
| <i>Biserrula pelecinus</i> | | | | 2 | 4 |
| <i>Diplotaxis virgata</i> | | | | 1 | |
| <i>Filago pyramidata</i> | | | | 1 | |
| <i>Erodium cicutarium</i> | | | | 1 | 1 |
| Briofitos | | | | 50 | 20 |
| <i>Anthemis arvensis</i> | 1 | | | | |
| <i>Spergularia arvensis</i> | | | | | 40 |

5.2) CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS SUELOS

5.2.1) TEXTURA

De acuerdo al porcentaje de arena, limo y arcilla encontrado en las muestras de suelo, la textura se clasifica como arenosa (Tabla 7). Para interpretar los datos provenientes del análisis físico se utilizó el triángulo textural propuesto por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), con el que de acuerdo al porcentaje de partículas encontradas se puede clasificar la muestra en cualquiera de las 12 texturas existentes.

Tabla 7. Análisis Granulométrico

| Parcelas | % de arena gruesa | % de arena fina | % de arcilla | % de limo |
|----------|-------------------|-----------------|--------------|-----------|
| 1 | 85,73 | 11,41 | 1,49 | 1,37 |
| 2 | 79,67 | 12,64 | 5,96 | 1,73 |
| 3 | 90,87 | 7,14 | 1,79 | 0,17 |

| | | | | |
|---|-------|-----|------|------|
| 4 | 85,6 | 8 | 4,67 | 1,73 |
| 5 | 83,06 | 9,3 | 5,44 | 2,2 |

5.2.2) pH

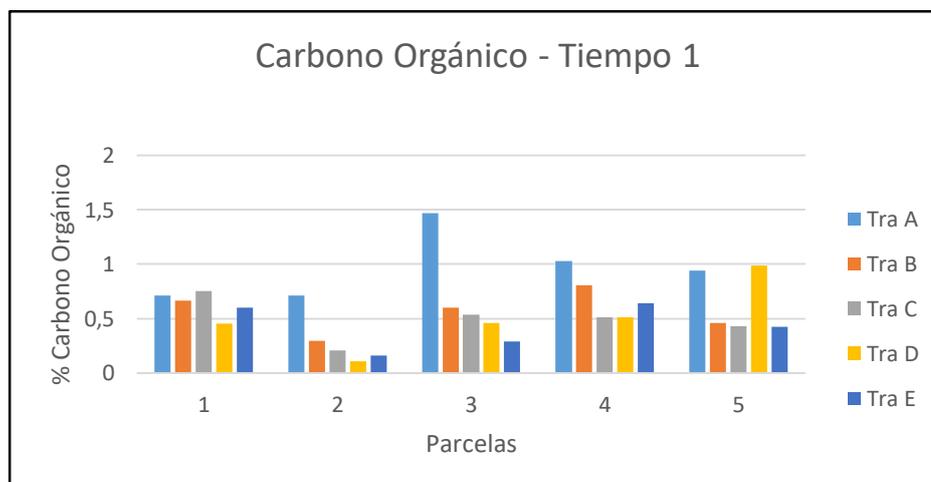
El pH obtenido en las 5 parcelas se encuentra en el rango de 6 a 7,02 para el análisis de pH en H₂O. Por su parte el pH valorado en KCl, el rango se mantuvo entre 4,62 y 5,22. Lo cual muestra suelos moderadamente ácidos y pobres en bases (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación de pH en agua y KCl para las cinco parcelas.

| Parcelas | pH en H ₂ O | pH en KCl |
|----------|------------------------|-----------|
| 1 | 6,34 | 4,62 |
| 2 | 7,02 | 5,22 |
| 3 | 6,69 | 5,21 |
| 4 | 6,33 | 4,7 |
| 5 | 6 | 5,1 |

5.2.3) CARBONO ORGÁNICO

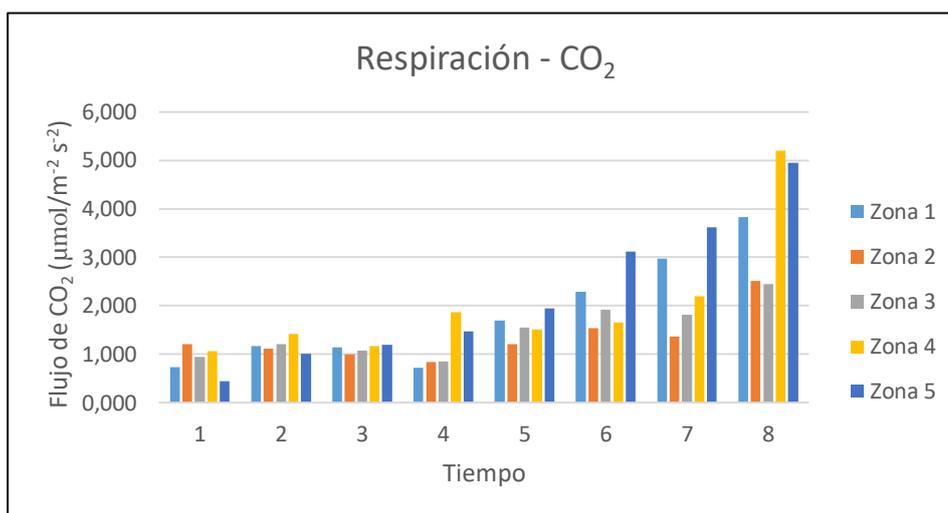
El carbono orgánico obtenido en las 5 parcelas muestra un rango que oscila entre 0,1% y 1,5% (gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje del carbono orgánico en el tiempo 1 en las 5 parcelas.

5.3) RESPIRACIÓN

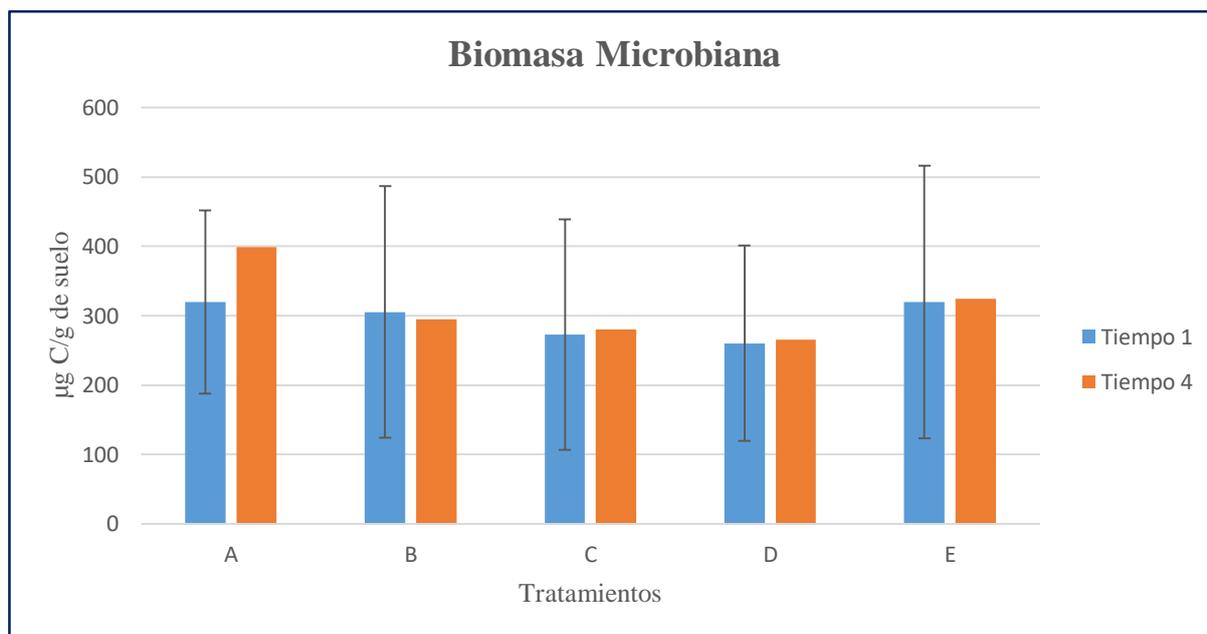
Respecto a los resultados obtenidos en la respiración, se puede observar en la gráfica que la respiración aumenta conforme al tiempo de muestreo. Esto concuerda con los datos de precipitación, lo cual muestra una relación estrecha entre la humedad del suelo y la respiración.



Gráfica 3. Medida de respiración a lo largo de la investigación.

5.4) BIOMASA MICROBIANA

Por su parte, los valores obtenidos sobre la biomasa microbiana mostraron una tendencia al aumento en el tratamiento A, por su parte los otros tratamientos mantuvieron los valores similares, tanto en el tiempo 1 como en el tiempo 4 (Gráfica 4).



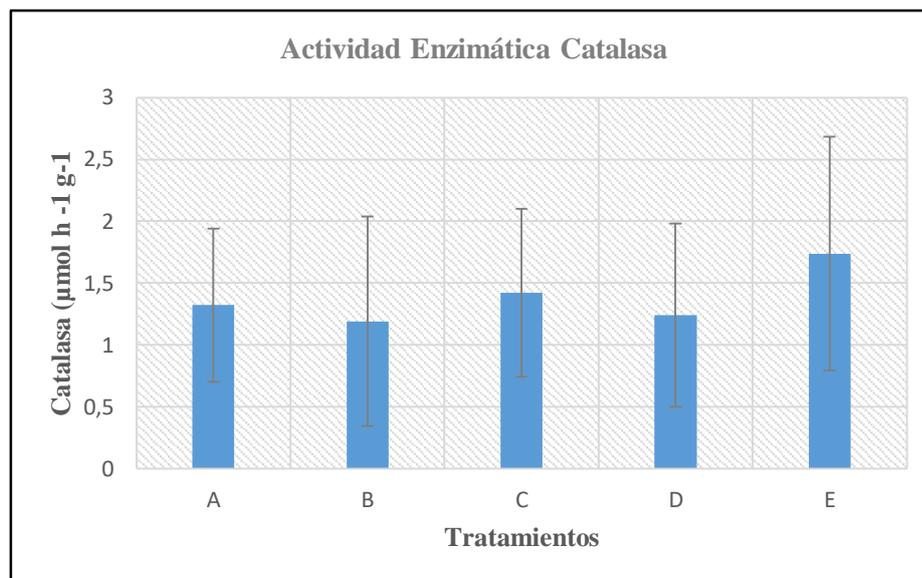
Gráfica 4. Biomasa microbiana al inicio y final del experimento en cada tratamiento.

5.5) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

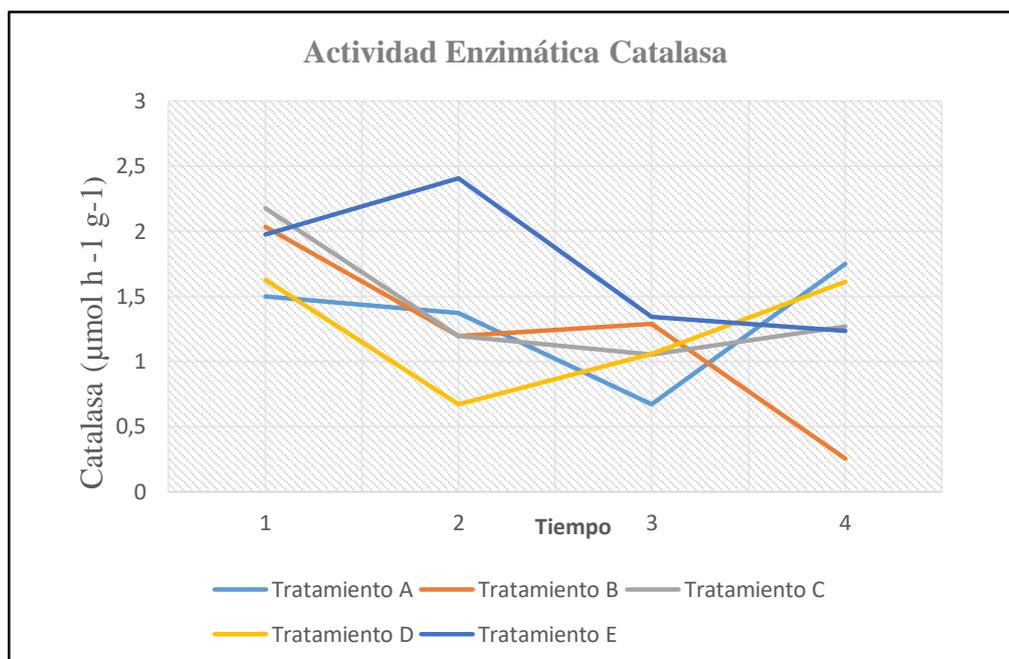
5.5.1) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CATALASA

Los resultados obtenidos en los promedios de la actividad enzimática de la catalasa de cada uno de los tratamientos, se encuentran en un rango, entre 1,192 y 1,739 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$. Mostrando un comportamiento similar entre tratamientos. Sin embargo, se puede observar un leve aumento en los tratamientos C y E (Gráfica 5).

Por su parte el comportamiento temporal de la actividad enzimática de la catalasa muestra una tendencia al aumento a partir del tiempo 3, influenciada por el aumento en la humedad de la zona de estudio (Gráfica 6).



Gráfica 5. Actividad enzimática de la catalasa en los 5 tratamientos (n=20).

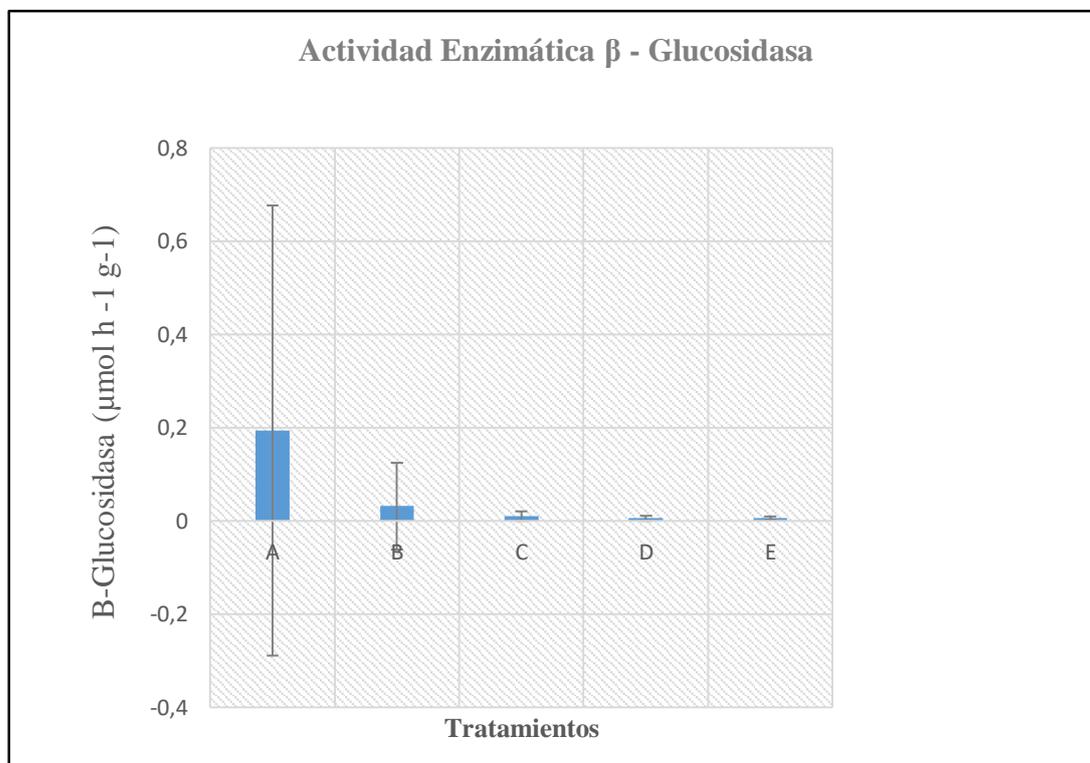


Gráfica 6. Evolución temporal de la actividad enzimática de la catalasa en cada tratamiento (n=5).

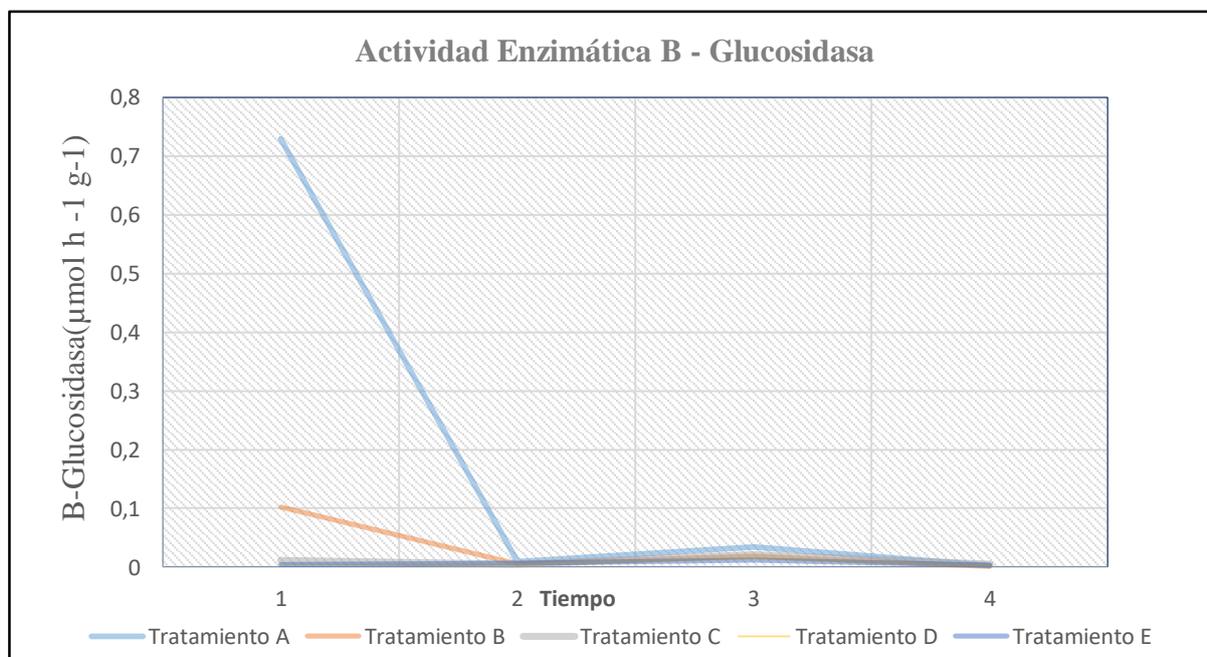
5.5.2) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUCOSIDASA

Los resultados obtenidos para la enzima β -Glucosidasa se presentan en un rango de 0,006 a 0,193 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$. Esta variabilidad en los resultados se evidencia en el tratamiento A donde se observa una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos. Por su parte la evolución temporal, si bien se observa con muy pocos cambios a lo largo del estudio,

se puede ver un aumento de la actividad en todos los tratamientos hacia el tiempo 3 (Gráfica 7,8).



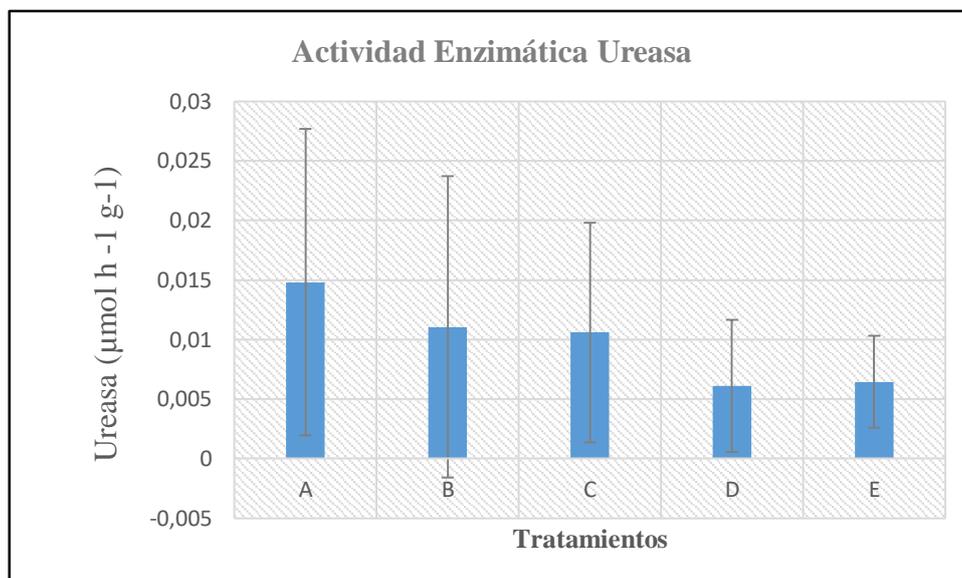
Gráfica 7. Actividad enzimática de la β -glucosidasa en los 5 tratamientos (n=20).



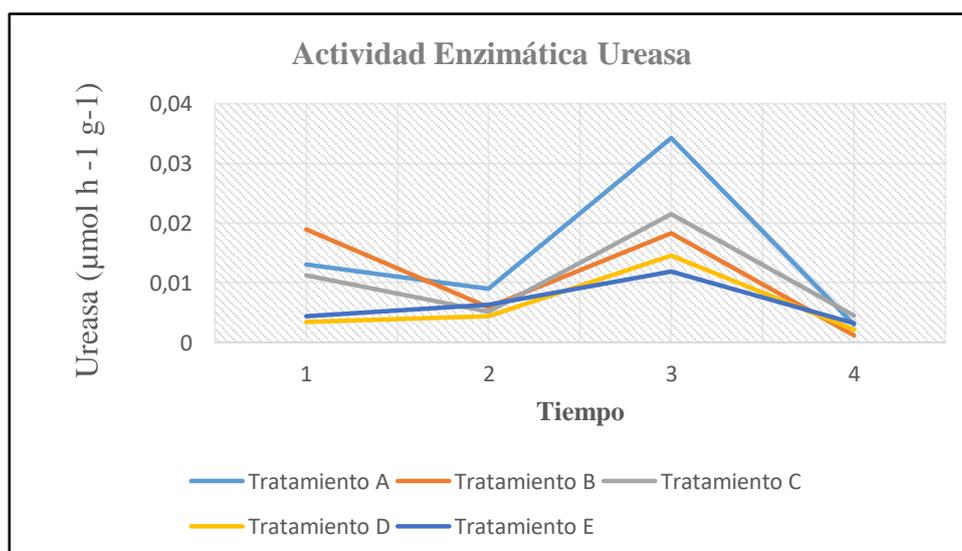
Gráfica 8. Evolución temporal de la actividad enzimática de la β - Glucosidasa en cada tratamiento (n=5).

5.5.3) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA UREASA

Como se puede observar el tratamiento A (campo) es el que mayor actividad enzimática muestra a lo largo del periodo de estudio. Por su parte los tratamientos restantes presentan una disminución en su actividad, especialmente el tratamiento D. Así mismo, se puede observar que en la evolución temporal, la presencia de humedad a partir del muestreo 3 potenciaron la actividad de la enzima ureasa, sin embargo, hacia el muestreo 4 su actividad se ve disminuía notablemente (Gráfica 9,10).



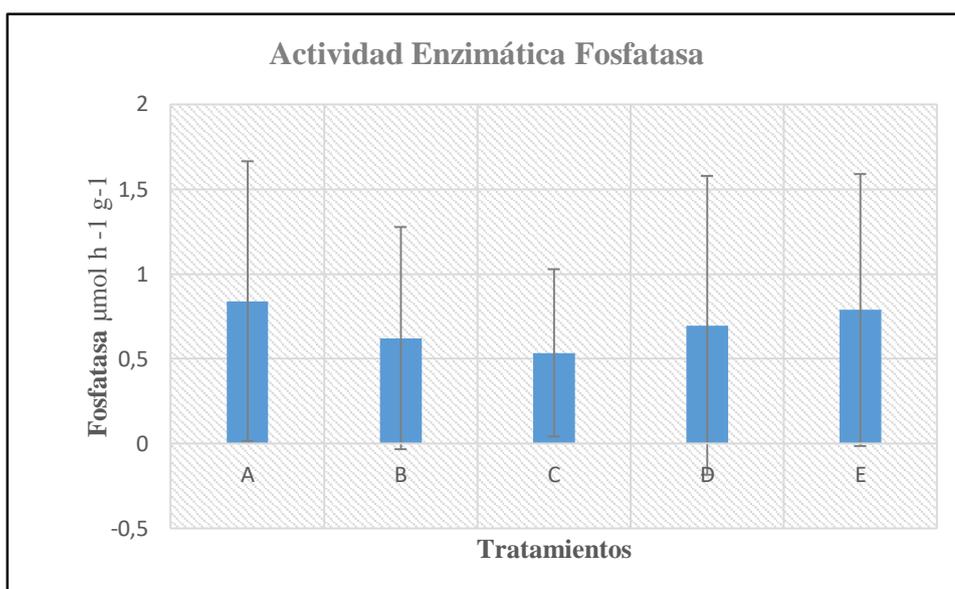
Gráfica 9. Actividad enzimática de la ureasa en los 5 tratamientos (n=20).



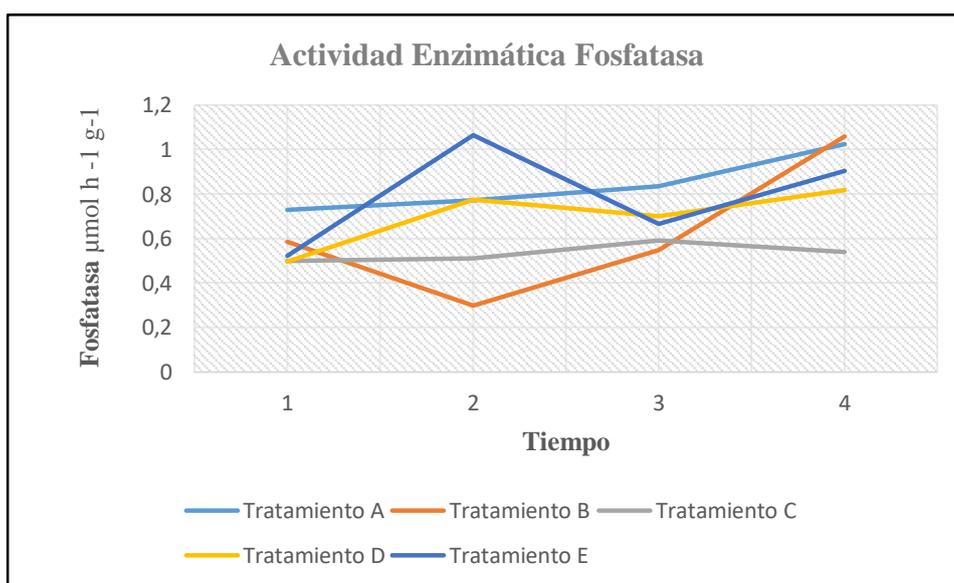
Gráfica 10. Evolución temporal de la actividad enzimática de la ureasa en cada tratamiento (n=5).

5.5.4) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOSFATASA

Como se puede observar en la gráfica, el tratamiento A fue el que presentó mayor actividad, seguido del tratamiento E mientras los tratamientos B, C y D tienden a mantener una actividad similar. En lo que respecta a la evolución temporal, se puede evidenciar en la gráfica que en el tiempo 3 la actividad enzimática aumenta en todos los tratamientos a excepción del tratamiento que presenta una leve disminución (Gráfica 11,12).



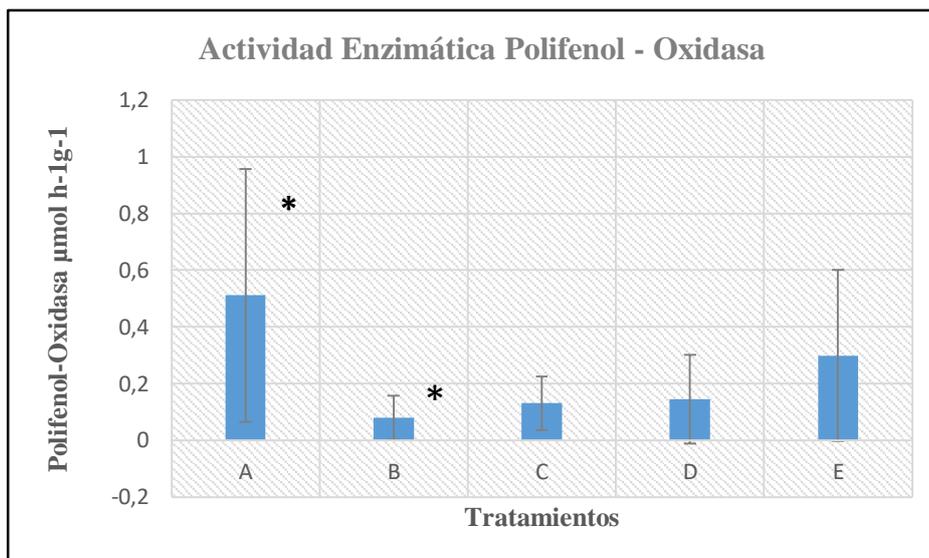
Gráfica 11. Actividad enzimática de la fosfatasa en los 5 tratamientos (n=20).



Gráfica 12. Evolución temporal de la actividad enzimática de la fosfatasa en cada tratamiento (n=5).

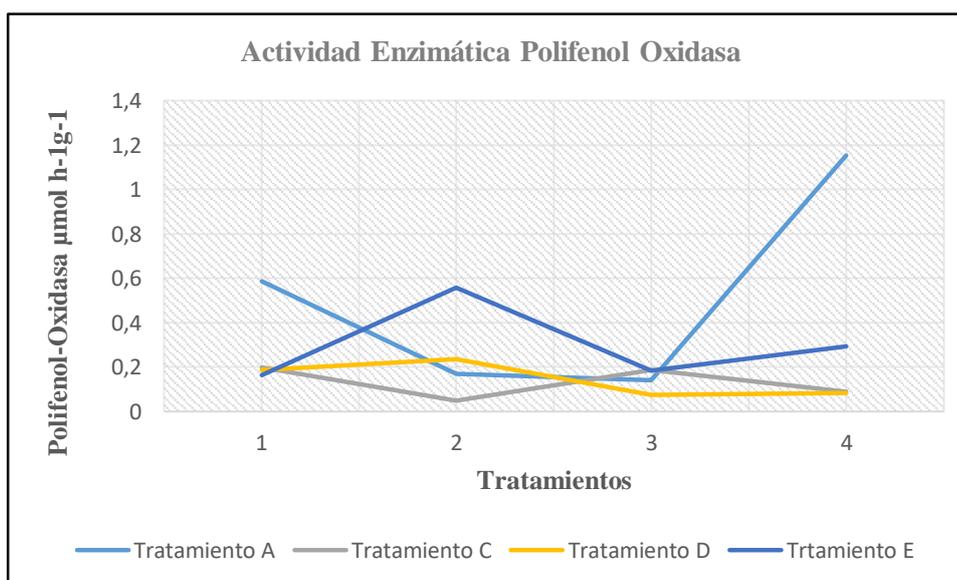
5.5.5) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POLIFENOL OXIDASA

En relación a los promedios de la enzima polifenol oxidasa en cada tratamiento, los valores oscilaron entre 0,007 y 0,5 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$. Mostrando una mayor actividad para el tratamiento A y una baja actividad para el tratamiento B. Por su parte en la gráfica de evolución temporal, se puede observar que se presenta un aumento en la actividad a partir del muestreo 3, sobre todo para el tratamiento A (Gráfica 13, 14).



Gráfica 13. Actividad enzimática de la Polifenol Oxidasa en los 5 tratamientos (n=20).

* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



Gráfica 14. Evolución temporal de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa en cada tratamiento (n=5).

5.6) ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En los resultados obtenidos en el análisis ANOVA, se evidencia que hubo un porcentaje de variación alto entre los datos arrojados para cada enzima. Así mismo se observa que existe una diferencia significativa entre grupos de enzimas. Por otra parte, respecto a las diferencias que existen entre tratamientos, se puede ver que existen diferencias significativas entre los tratamientos A, B y C para la enzima polifenol Oxidasa y el tratamiento D para la enzima ureasa (Tabla 9,10).

Tabla 9. Estadística descriptiva de la actividad de las 5 enzimas.

| | B- Glucosidasa | Polifenol oxidasa | Catalasa | Ureasa | Fosfatasa |
|------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------|---------------|------------------|
| Mínimo | 0,111 | 0,00236 | 0,0921 | 0,00010 | 0,005 |
| Máximo | 2,147 | 1,23867 | 3,67091 | 0,05674 | 2,910 |
| Promedio | 0,451 | 0,223 | 1,358 | 0,009 | 0,692 |
| Desviación Estándar | 0,397 | 0,293 | 0,781 | 0,0097 | 0,397 |
| % Variación | 87,92 | 131,54 | 57,5 | 98,09 | 108,2 |
| Sig. Entre grupos | 0,399 | 0,000 | 0,156 | 0,025 | 0,719 |

Tabla 10. Significancia entre las enzimas y los tratamientos.

| Tratamiento | Tratamiento | Catalasa Sig. | Polifenol oxidasa Sig. | β - Glucosidas Sig. | Fosfatasa Sig. | Ureasa Sig. |
|-------------|-------------|------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------|----------------|
| A | B | ,999 | ,001 | ,539 | ,905 | ,799 |
| | C | ,969 | ,006 | ,520 | ,719 | ,703 |
| | D | 1,000 | ,010 | ,443 | ,960 | ,039 |
| | E | ,221 | ,611 | ,798 | 1,000 | ,053 |
| B | A | ,999 | ,001 | ,539 | ,905 | ,799 |
| | C | ,920 | ,976 | 1,000 | ,996 | 1,000 |
| | D | 1,000 | ,943 | 1,000 | 1,000 | ,457 |
| | E | ,173 | ,082 | ,994 | ,958 | ,526 |
| C | A | ,969 | ,006 | ,520 | ,719 | ,703 |
| | B | ,920 | ,976 | 1,000 | ,996 | 1,000 |
| | D | ,970 | 1,000 | 1,000 | ,982 | ,557 |
| | E | ,624 | ,280 | ,993 | ,830 | ,629 |

| | | | | | | |
|---|---|-------|-------------|-------|-------|-------------|
| D | A | 1,000 | ,010 | ,443 | ,960 | ,039 |
| | B | 1,000 | ,943 | 1,000 | 1,000 | ,457 |
| | C | ,970 | 1,000 | 1,000 | ,982 | ,557 |
| | E | ,257 | ,365 | ,982 | ,986 | 1,000 |
| E | A | ,221 | ,611 | ,798 | 1,000 | ,053 |
| | B | ,173 | ,082 | ,994 | ,958 | ,526 |
| | C | ,624 | ,280 | ,993 | ,830 | ,629 |
| | D | ,257 | ,365 | ,982 | ,986 | 1,000 |

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

6) DISCUSIÓN

En relación al pH obtenido en H₂O para las 5 parcelas el rango se encuentra entre 6 y 7,02, es decir, suelos moderadamente ácidos (Tabla 5), mientras que el pH en KCl, los resultados estuvieron comprendidos entre de 4,6 y 5,22 considerablemente más ácidos, lo que pone de manifiesto que los suelos se encuentran desaturados.

Por otra parte, el carbono orgánico detectado en la zona de estudio se encuentra entre 0,1% y 1,5%. Se trata de contenidos bajos debido a que la textura del suelo es arenosa, presentando el suelo una alta porosidad y poca agregación lo cual favorece los procesos de mineralización.

Por otro lado, la respiración del suelo a escala global se encuentra controlada principalmente por la temperatura y la precipitación (Raich 2002). Durante el estudio se observó que los valores de respiración del suelo aumentaron en función del tiempo, esto a su vez coincide con los episodios de lluvias que ocurrieron en la zona. De esta manera se logra observar una relación positiva con la humedad. A pesar de que la temperatura se presenta generalmente como el principal factor de control de las tasas de respiración del suelo, en esta zona el factor limitante recae sobre el agua. Ya que, después de un extraordinario periodo de sequía ocurrido en la zona de estudio, la llegada de las lluvias supuso un incremento en la actividad vital de toda la comunidad microbiana, creando picos de producción de CO₂ en respuesta a los eventos de precipitación. Este resultado coincide con diversos autores, tales como Curiel Yuste et al., (2003) y Huxman et al., (2004).

Los valores obtenidos de la biomasa microbiana a lo largo del estudio oscilan entre 260,418 $\mu\text{gC/g}$ y 398,650 $\mu\text{gC/g}$ resultados un poco bajos, sin embargo, los valores no son sorprendidos, ya que, la biomasa microbiana constituye el componente vivo de la materia orgánica del suelo y estos fueron significativamente bajos. No obstante estos valores concuerdan con la literatura, ya que usualmente se han identificado valores para el C de la biomasa microbiana entre 100 $\mu\text{gC/g}$ y 1000 $\mu\text{gC/g}$.

Así mismo, se observa un aumento en la biomasa microbiana en el tratamiento A (campo) la cual paso de 320,067 $\mu\text{gC/g}$ suelo en el tiempo 1 a 398,650 $\mu\text{gC/g}$. Si bien es cierto que el aumento no es considerable, se puede observar un leve crecimiento a lo largo del estudio. Este aumento se puede suponer que se debe a condiciones climáticas de temperatura y humedad ya que al observar los tratamientos B, C, D y E se evidencia que el aumento en la biomasa microbiana es casi nulo lo cual confirma la importancia de la temperatura y la humedad en la producción de la biomasa microbiana en el suelo, ya que, estos tratamientos se han modificado las condiciones de temperatura y humedad. Esto concuerda con Dalal 1998 y Tereza 2008 quienes afirman que la biomasa microbiana se ve influida por la cantidad de materia orgánica y por factores climáticos. Así mismo, Van Gestel et al (1991) menciona que las alteraciones en la biomasa microbiana, como el descenso de la misma, parecen estar determinadas por propiedades de las comunidades microbianas, su tipología y actividad, además de las condiciones climáticas a las que se ve sometido el suelo, esta última característica fue significativamente importante a lo largo de la investigación, ya que durante la época de estudio, se produjo un periodo extraordinario de sequía seguido de lluvias constantes, características típicas de cambio climático.

Respecto a los resultados obtenidos de la actividad enzimática, muestran una variación importante entre las diferentes enzimas y en todos los tratamientos. En la tabla 4 se puede observar que los porcentajes de variación fueron valores cercanos al 100% a excepción de la enzima catalasa que mostro un porcentaje próximo al 50%. Estas variaciones podrían estar relacionadas con las condiciones ambientales a las que fueron expuestas las muestras. Ya que, tanto los tratamientos llevados a cabo en el diseño experimental como las muestras de campo estuvieron expuestas a un estrés ambiental, tanto a nivel de temperatura como de humedad.

Estos dos factores, como se mencionó anteriormente, juegan un papel importante en el funcionamiento del suelo y esto se corrobora en la variación que se obtuvo de los resultados

arrojados durante la investigación, mostrando una tendencia a la disminución en la actividad enzimática con el aumento de la sequía y esto concuerda con los resultados reportados por Li y Sarah en 2003, quienes evidenciaron una disminución en la actividad enzimática del suelo después de un periodo de sequía.

En relación a la actividad enzimática de la catalasa, los valores obtenidos estuvieron comprendidos entre 0,092 y 3,67 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$, siendo esta enzima la que presentó menor variabilidad en sus resultados, con un 57,5%. Respecto al comportamiento en la evolución temporal de la enzima en los distintos tratamientos, se puede observar que en el tratamiento A los fuertes periodos de precipitaciones influyeron positivamente en el aumento de la actividad enzimática. A su vez, se puede observar que el comportamiento de la catalasa en el tratamiento B, C Y D es similar al del tratamiento A, los cuales tienen como similitud una humedad promedio, sin embargo cabe resaltar que en el tratamiento E la actividad enzimática mostró cambios significativos, evidenciando una mayor actividad bajo estas condiciones.

Los valores obtenidos en la actividad enzimática de la β glucosidasa variaron de 0,111 a 2,147 con un promedio de 0,451 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$. A pesar de la variabilidad en los resultados obtenidos, se puede ver que el tratamiento A mantuvo mayor su nivel a lo largo del estudio, lo que demuestra que las condiciones de campo favorecieron la actividad de la enzima y por el contrario las condiciones modificadas en el modelo experimental afectaron su producción. Así mismo, cabe resaltar que en el tratamiento A (condiciones de campo) en la evolución temporal de la enzima β -glucosidasa presentó un aumento levemente significativo en el tiempo 3, seguido de una disminución en el tiempo 4, lo cual podría indicar que aunque la humedad es fundamental para la actividad de esta enzima, periodos de precipitación fuertes podrían causar una disminución en la actividad debido a un estrés hídrico para los microorganismos allí presentes. Estudios reportan valores muy variados para esta enzima, entre 69,5 y 850,7 $\mu\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Paz-Ferreiro et ál. 2007), y entre 12,51 y 562,957 $\mu\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Paul y Clark 2007), encontrándose los valores de este estudio dentro de estos rangos.

Por su parte la actividad enzimática de la ureasa reportó valores que oscilan entre 0,0001 y 0,056 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$, con un porcentaje de variación del 98%. A su vez en el análisis ANOVA se evidencia que existen diferencias significativas entre los tratamientos A y D, en donde se observa una actividad del tratamiento D considerablemente menor al del tratamiento A (Tabla

10), lo que supone un efecto negativo de la temperatura sobre la actividad enzimática ya que, el tratamiento B presentaba una temperatura del 20°C. A su vez, en las gráficas de evolución temporal (gráfica 10) se observa la tendencia a aumentar su actividad a medida que la humedad en el suelo es mayor, no obstante, en el momento que ocurre el mayor pico de humedad (tiempo 4) durante el estudio, la actividad de la ureasa desciende abruptamente, teniendo así un comportamiento similar a la enzima β -glucosidasa, donde un aumento de la humedad favorece su funcionamiento, pero, un exceso en ella produce un bloqueo en su actividad enzimática. Posiblemente esto se deba a que un mayor contenido de humedad representa una pérdida en la cantidad de oxígeno y por ende una inhibición en los microbios activos, responsables en su mayoría de la actividad enzimática del suelo (Troeh y Thompson, 2005).

La fosfatasa mostro una variabilidad alta, con un 108%, siendo esta, la segunda con mayor diferencia entre los valores. Los resultados están comprendido entre 0,005 y 2,910 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$. Sin embargo el promedio de los resultados obtenidos para la enzima fosfatasa mostraron un comportamiento similar entre tratamientos y esto se evidencia en la estadística, donde no se observan diferencias significativas. Por su parte en la gráfica de evolución temporal (Gráfica 12) se observa un leve crecimiento en los muestreos realizados en el tiempo 4 para el tratamiento A, lo cual coincide con la enzima catalasa, donde la humedad presentada durante este periodo produjo un crecimiento en la actividad enzimática del suelo. Resultados similares fueron hallados por Pavani, Chandrasekhar, Padmaja y Naveen (2017) y Vandana (2012) quienes encontraron un aumento en la actividad enzimática a partir de porcentajes de humedad del 30% en adelante.

En lo que se refiere a la actividad enzimática de la polifenol-oxidasa, los valores oscilaron entre 0,00236 y 1,23 con un promedio de 0,022 $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$, manifestando la más alta variabilidad entre las enzimas, con un 131%. Por su parte hubo diferencias significativas en el comportamiento de la enzima para los tratamientos A, B y C (Tabla 10).

En el tratamiento A se observa la importancia de la humedad para su correcto desarrollo enzimático, pues los picos más altos obtenidos de la enzima, correspondieron con el tiempo 4 que a su vez coinciden con la época de precipitaciones altas (marzo) (Gráfica 14). Esto concuerda con lo planteado por Tripathi et al (2006), quien asegura que una sequía prolongada produce una reducción sustancial del carbono orgánico del suelo y a su vez de la actividad enzimática del mismo, mostrando así que la humedad ejerce una profunda influencia sobre el

suelo, tanto en la producción de enzimas, como, en la disponibilidad de nutrientes. De igual forma, Sardans y Penuclas (2010), confirman esta idea a partir de una investigación realizada en bosques mediterráneos, donde demuestran una reducción de la actividad enzimática hasta de un 25% después de un periodo considerable de sequía.

Respecto al análisis estadístico realizado en el estudio, se logra confirmar y corroborar las diferencias que existen entre los tratamientos frente a la actividad enzimática a partir del análisis de varianza a un valor de significancia del 0,05%, pues el tratamiento A, B y C en la polifenol oxidasa evidencia diferencias significativas. De igual forma para la encima ureasa, también se logra ver diferencias significativas entre los tratamientos A y D, esto se ve corroborado en el análisis entre grupos donde los resultados muestran una diferencia significativa para la enzima polifenol oxidasa y ureasa, (Tabla 9). A su vez en el análisis entre tratamientos (Tabla 8) se observa que los valores correspondientes a sigma, se encuentran por debajo del valor de significancia propuesto en el estudio para las dos enzimas mencionadas anteriormente. Así mismo, queda en evidencia que las modificaciones realizadas a cada uno de los tratamientos, presentan diferencias entre ellos y esto se corrobora en el comportamiento de la actividad enzimática mostrada en cada una de las gráficas.

7) CONCLUSIONES

- Las especies predominantes en las 5 parcelas fueron: *Xolantha guttata*, *Trifolium arvense*, *Agrostis pourretii*, *Vulpia myuros* y *Hypochaeris glabra*, demostrando la similitud entre los puntos de muestreo.
- Los suelos estudiados corresponden a suelos arenosos, ligeramente ácidos con valores promedio bajos de carbono orgánico, que oscilan entre 0,1% y 1,5%.
- La biomasa microbiana y la respiración presentan una correlación positiva y a su vez están influenciadas por las condiciones climáticas (humedad y temperatura del suelo).
- El periodo extraordinario de sequía que se presentó durante la investigación, tuvo un efecto negativo en la actividad enzimática del suelo, suponiendo una inhibición

en la actividad microbiana del suelo y por ende una disminución evidente de su proceso enzimático.

- La humedad del suelo representa un factor limitante para el correcto funcionamiento enzimático del suelo en todas las enzimas analizadas durante el estudio, sin embargo, un exceso de humedad representa una inhibición de la actividad enzimática para algunas enzimas como la β -glucosidasa y la ureasa.
- De los resultados obtenidos en el análisis de varianza, se evidencia que, entre los tratamientos y las enzimas, existen diferencias significativas, especialmente para la polifenol oxidasa y la ureasa.

8) BIBLIOGRAFÍA

- AUSTIN. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141 221-235.
- Belser, L y Mays, E. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 505-510.
- Caldwell, B. (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiología* 49:637- 644.
- CARPA R. (2009). Enzymological research on soils from different environments. *Annals of RSCB* 16(1):44- 48.
- Chengjie. R., Wei. Z., ZeKun. Z., Gaihe. Y., Yongzhong. F., Guangxin. R. (2018). Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics. *Science of the Total Environment*. 610-611, 750- 758.
- Collins., M. et al. (2013). The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, New-York.
- Curiel, Y., Janssens, A., Carrara, A., Meresonne, L. y Ceulemans, R. (2003). Interactive effects of temperature and precipitation on soil respiration in a temperate maritime pine forest. *Tree Physiology* 23: 1263-1270.
- Dacal, M., Bradford. M., Plaza. C., Maestre. F and García-Palacios. P. (2019). Soil microbial respiration adapts to ambient temperature in global drylands. *Nature Ecology & Evolution*. 3, 232-238.
- Dalal, R. (1998). Soil microbial biomass. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 649-655.
- Davidson, E. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440, 165-173.
- Day, R. (1965). Pipette method of particle size analysis. *In : Methods of soil analysis. Agronomy*. 9, 553 – 562.
- Duran, N. & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: Environmental*, 28(2), 83-99.

- Eivazi, F. & Tabatabai, M. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil biology and biochemistry*, 20(5), 601-606.
- Esteban-Parra, M, Rodrigo, F. & Castro-Diez, Y. (1998). Spatial and temporal patterns of precipitation in Spain for the period 1880–1992. *International Journal of Climatology*, 18 (14), 1557–1574.
- Fao. (2017).Fao. <http://www.fao.org/docrep/009/a0100e/a0100e04.htm>.
- Gajda A. & Martyniuk, S. (2005). Microbial Biomass C and N and Activity of Enzymes in Soil under Winter Wheat Grown in Different Crop Management. Systems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(2) 159-163.
- Giacometti, C., Demyan, M.S., Cavani, L., Marzadori, C., Ciavatta, C. & Kandeler, E. (2013). Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. *Applied Soil Ecology*, 64, 32–48.
- Gianfreda, L., Rao, M. A. (2008). Interactions between Xenobiotics and Microbial and Enzymatic Soil Activity. Critical Reviews, *Environmental Science and Technology*, 38, 269–310.
- Gutián, F., Carballas, T. (1976). Técnicas de análisis de suelos. Pico Sacro, Santiago de Compostela. España.
- Hartmann.M., Brunner.I., Hagedorn. F., Bardgett. R., Stierli. B., Chen.X., Zingg. A. 2017. A decade of irrigation transforms the soil microbiome of a semi-arid pine forest. *Molecular Ecology* 26: 1190–1206.
- Houghton J., Ding Y., Griggs D.J., Nogueir M., Van der Lindern, P.J, Dai, X., Maskell, K. & Johnson, C. (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis. Cambridge: *Cambridge University Press*.
- Huxman, T., Snyder, K., Tissue, A., Leffler, J., Ogle,K., William, T.,... Schwinning, S. (2004). Precipitation pulses and carbon fluxes in semiarid and arid ecosystems. *Oecologia* 141:254-268.
- ISO/TEC-190/SC4. Soil quality: <https://www.iso.org/committee/54328.html>
- Iglesias, T. (2008). Estudio del carbono de la biomasa microbiana en suelos alterados. *Lazaroa* 29: 117.123.
- Jiang, M.G. & Zhang, J.H. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2401–2410.

- Kandeler, E. & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and fertility of soils*, 6 (1), 68-72.
- Karmakar, R., Das, I., Dutta, D., Rakshit, A. (2016). Potential effects of climate change on soil properties. A review. *Science International*, 4 (2) 51-73.
- Kim, S.-Y., Lee, S.H., Freeman, C., Fenner, N. & Kang, H. (2008). Comparative analysis of soil microbial communities and their responses to the short-term drought in bog, fen, and riparian wetlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2874–2880.
- Kutiel, H. y Maheras, P. (1998). Variations in the temperature regime across the Mediterranean during the last century and their relationship with circulation indices. *Theoretical and Applied Climatology*, 61, 39–53.
- Kyaw.A., Yanjuan,J and Sheng Yang He. (2018). The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal*, 93, 771–780.
- Leirós, M., Trasar, C., Seoane, S., Gil-Sotres, F. (1998). Dependence of mineralization of soil organic matter on temperature and moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 327-335.
- Li, X.Z., Sarah, P. (2003). Enzyme activities along a climatic transect in the Judean Desert. *Catena*. 53, 349–363.
- Nannipieri, P., Muccini, L. y Ciardi, C. (1983). Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. *Soil Biology and Biochemistry*, 15, 679-685.
- Paul E.A. & Clark F.E. (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, 3-24.
- Pavani, P., Chandrasekhar R., G. Padmaja and Naveen K. (2017). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 (8): 3081-3087.
- Paz-Ferreiro J., Trasar-Cepeda C., Leirós M.C., Seoane S., Gil-Sotres F. (2007). Biochemical properties of acid soils under native grassland in a temperate humid zone. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 50(4):537-548.
- Peñuelas, J., Filella, I., Sabaté, S. & Gracia, C. (2005). Natural systems: terrestrial ecosystems. *Report on Climate Change in Catalonia* ; Llebot, J.E. Ed., Barcelona: Institut d'Estudis Catalans, 517–553.
- Phillips, C. & Nickerson, N. (2015). Soil Respiration. *Reference Module in Earth systems and Environmental Sciences*. 1-10.
- Pind, A., Freeman, C., Lock, M. (1994). Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands measurement of phenol oxidase activity. *Plant and soil*, 159, 227-331.
- Raich, J. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration ant its relationship to vegetation and climate. *Tellus 44b*, 81-99.

- Raich, J.W. & Tufekcioglu, A. (2000). Vegetation and soil respiration: Correlations and controls. *Biogeochemistry*, 48, 71–90.
- Raich, J.W., C.S. Potter and D. Bhagawati. (2002). Interannual variability in global soil respiration, 1980–94. *Global Change Biol.* 8: 800–812.
- Rey, A., Pegoraro, A. (2002). Annual variation in soil respiration and its components under an oak coppice forest in central Italy. *Global Change Biology* 8, 851-866.
- Rustad, L.E., Campbell, J.L., Marion, G.M., Norby, R.J., Mitchell, M.J., Hartley, A.E., Cornelissen, J.H.C. & Gurevitch, J. (2001). A meta-analysis of the response of soil respiration, net N mineralisation, and above-ground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia* 126, 543–562.
- Sabaté, S., Gracia, C. & Sánchez, A. (2002). Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster* *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *Forest Ecology Management*, 162, 23–37.
- Sardans, J. & Peñuelas, J. (2004). Increasing drought decreases phosphorus availability in an evergreen Mediterranean forest. *Plant and Soil*, 267, 367–377.
- Sardans, J., y Peñuelas, J. (2010). Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. Forest. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 455- 461.
- Shi, W.; Yao, H., Bowm, D. (2006). Soil microbial biomass, activity and nitrogen transformations in a turfgrass chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*. 38 (2) 311 – 319.
- Shonkor. K., Ajit. V. (2010). Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. *Soil Biology*. 22, 25- 42.
- Silva, C.C., Guido, M.L., Ceballos, J.M., Marsch, R. & Dendooven, L. (2008). Production of carbon dioxide and nitrous oxide in alkaline saline soil of Texcoco at different water contents amended with urea: A laboratory study. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1813–1822.
- Solly.E., Lindahl.B., Dawes. M., Peter.M., Souza.R., Rixen.C., Hagedorn. F. (2017). Experimental soil warming shifts the fungal community composition at the alpine treeline. *New Phytologist* 215: 766–778.
- Tabatabai, M. Soil enzymes. Methods of soil analysis : part 2 – Microbiological and biochemical properties. Methos of soil : 775-833
- Tabatabai, M., Bremner, J. (1969) Use of p-nitrophenyl phosphate fr assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemestry*, 1(4), 301-307.

- Tripathi, K. P., Harsh, L.N., Rao, A.V. y Praveen-kumar. (2006). Impact of Polluted. underground water from seepage of industrial effluents on soil properties and growth of acacia Senegal. *Journal of the Indian of Soil Science*. 54(1): 101- 105.
- Unger, I.M., Kennedy, A.C. & Muzika, R.-M. (2009): Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 42, 1–8.
- Vance, E., Brookes, C. & Jenkinson, J. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
- Van Gestel, M., Ladd, J.N., y Amato, M. (1991). Carbon and Nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and micro aggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biol. Biochem* 23: 313-322.
- Wally, A., Black, A. (1934). An examinaion of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sciences*. 37, 27-38.
- Whitford, W. (2002). Ecology of desert systems. *Academic Press*.
- Zeppel. M., Wilks. J and Lewis. J. (2014). Impacts of extreme precipitation and seasonal changes in precipitation on plants. *Biogeosciences*, 11, 3083–3093.