



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

## **ÁREA BIOLÓGICA**

### **TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**“Comparación de dos métodos para determinar el carbono de la biomasa microbiana en suelos provenientes del Sur del Ecuador”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**AUTORA:** Ochoa Luzuriaga, Rita Paulina

**DIRECTOR:** Burneo Valdivieso, Juan Ignacio, Dr.

**LOJA – ECUADOR**

**2015**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2015

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor.

Juan Ignacio Burneo Valdivieso.

### DOCENTE DE TITULACIÓN

#### De mis consideraciones:

Que el presente trabajo, denominado: “Comparación de dos métodos para determinar el carbono de la biomasa microbiana en suelos provenientes del Sur del Ecuador” realizado por la profesional en formación: Ochoa Luzuriaga Rita Paulina; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, octubre de 2015

f) .....

Dr Juan Ignacio Burneo Valdivieso

Cédula 1102823687

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Rita Paulina Ochoa Luzuriaga declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Comparación de dos métodos para determinar el carbono de la biomasa microbiana en suelos provenientes del Sur del Ecuador”, de la titulación de bioquímica y farmacia, siendo Dr Juan Ignacio Burneo Valdivieso director del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja, y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art.88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f. ....

Autora Ochoa Luzuriaga Rita Paulina

Cédula 1104935653

## DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a Dios por guiar mis pasos y ayudarme a superar los obstáculos que se me presentaron a lo largo del camino estudiantil.

A mis padres, Ing. Ángel Ochoa y Lic. Silvana Luzuriaga porque creyeron en mí y, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque gracias a ellos, hoy puedo ver alcanzada mi meta, este gran logro va para ustedes, ya que siempre han estado impulsándome en los momentos difíciles de mi carrera. Por lo que valen, por su fortaleza por su cariño y por lo que han hecho de mí, muchas gracias.

A mis hermanos Alex y Jessica que han sido mi apoyo, en este largo camino hasta aquí recorrido.

A mi familia en general ya que de una u otra manera contribuyeron para el logro de mi meta y por haber fomentado en mí el deseo de superación.

A Marco Rojas por todo el apoyo brindado y motivación para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros de aula, testigos de mis triunfos y fracasos, por haber compartido cinco años a lo largo de carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a la Universidad Técnica Particular de Loja, en especial al Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos, quienes hicieron posible el realizar este trabajo, así mismo a la Titulación de Bioquímica y Farmacia.

Al Dr. Juan Ignacio Burneo Valdivieso, director de tesis y Dra. Leticia Salomé Jiménez Álvarez quienes con su valiosa orientación permitieron la realización y culminación exitosa de esta investigación.

Quiero agradecer de manera muy especial a Daniel Capa Mora, quien con sus conocimientos, paciencia y tiempo, supo dirigirme con gran entereza a la culminación del presente trabajo.

A mis padres, hermanos y toda mi familia que siempre me estuvo apoyando durante el desarrollo de este proyecto.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA .....	ii
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	6
CAPÍTULO 1 .....	6
MÉTODOS PARA DETERMINAR LA RESPIRACIÓN DE SUELOS.....	9
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
METODOLOGÍA PARA LA FASE DE LABORATORIO .....	12
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
CAPÍTULO 4 CONCLUSIONES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CAPÍTULO 5 RECOMENDACIONES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
ANEXOS .....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Análisis de capacidad de campo de las muestras de suelo. ....	14
<b>Figura 2.</b> Botellas de incubación para la determinación de la respiración del suelo por el método del SIR. ....	16
<b>Figura 3.</b> Botellas de incubación para la determinación de la respiración del suelo por el método Basal. ....	17
<b>Figura 4.</b> Promedio de respiración inducida por el sustrato SIR, realizado en fase seca. ....	20
<b>Figura 5.</b> Respiración método Basal día uno y día siete incubación. ....	23
<b>Figura 6.</b> Respiración del suelo por los método Basal y SIR fase seca. ....	26
<b>Figura 7.</b> Respiración método basal y método SIR fase húmeda. ....	26
<b>Figura 8.</b> Muestras del suelo de Catamayo – Arenillas – ECSF. ....	40
<b>Figura 9.</b> Pesado de glucosa + talco. ....	40
<b>Figura 10.</b> Incubación a 25 °C . ....	40
<b>Figura 11.</b> Vertido del contenido de Cl <sub>2</sub> Ba con fenolftaleína. ....	40
<b>Figura 12.</b> Determinación del nivel de respiración. ....	41
<b>Figura 13.</b> Muestras del suelo de Catamayo – Arenillas. ....	42
<b>Figura 14.</b> Pesado de las muestras. ....	42
<b>Figura 15.</b> Incubación a 25° C. ....	42
<b>Figura 16.</b> Vertido del contenido de Cl <sub>2</sub> Ba con fenolftaleína. ....	42
<b>Figura 17.</b> Determinación del nivel de respiración. ....	43



## ABREVIATURAS

**% CC** = Capacidad de campo

**% H** = Porcentaje de humedad

**BaCl<sub>2</sub>** = Cloruro de bario

**HCl** = Ácido clorhídrico

**NaOH** = Hidróxido de sodio

**SIR** = Respiración inducida por sustrato

**RB** = Respiración Basal

**g** = Gramo

**°C** = Grados centígrados

**M** = Molaridad

**m** = Metros

**Kg** = Kilogramos

**C** = Carbono

**CO<sub>2</sub>** = Dióxido de carbono

**ug** = Microgramos

**C-CO<sub>2</sub>** = Carbono del CO<sub>2</sub>

**MO** = Materia orgánica

**ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>** = Microgramos de CO<sub>2</sub> gramos por hora

## RESUMEN

El objetivo principal del estudio fue comparar los métodos de respiración Basal (RB) y respiración inducida por el sustrato (SIR) de los suelos tomados de dos ecosistemas 1) Arenillas Catamayo y 2) Estación Científica San Francisco al Sur del Ecuador, los suelos fueron recolectados en dos fases (húmeda y seca). Con la finalidad de determinar el carbono de la biomasa microbiana se utilizó dos métodos: 1) Método Basal según la metodología de Isermeyer (1952), 2) Método SIR con la metodología de Anderson & Domsch (1978). En los resultados con el método SIR se encontró mayor respiración del suelo en el ecosistema 1, atribuyendo las diferencias encontradas a las características propias de este ecosistema. El método basal evaluado en diferentes fases y días resultó con mínimas variaciones entre las zonas estudiadas, debido a las condiciones ambientales de la zona y laboratorio. Se obtuvo valores de 9,30 a 14,99  $\mu\text{gCO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  fase húmeda y 10,67 a 15,86  $\mu\text{gCO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  en fase seca. En la comparación de métodos se indica que los dos son eficaces en la determinación del carbono de la biomasa microbiana en suelos.

**Palabras clave:** *CO<sub>2</sub>, respiración de suelo, método SIR, método Basal.*

## ABSTRACT

The main objective of the study was to compare the methods of basal respiration (RB) and the substrate-induced respiration (SIR) of soils taken from two ecosystems 1) Arenillas Catamayo and 2) Research Station San Francisco South of Ecuador, soils were collected in two phases (wet and dry). In order to determine the microbial biomass carbon two methods was used: 1) Basal method was evaluated according Isermeyer methodology (1952), 2) Method SIR with the methodology of Anderson and Domsch (1978). The SIR method results in increased soil respiration in the ecosystem 1, attributing the differences to the specific characteristics of this ecosystem. The basal method evaluated in different phases and days proved with minor variations among the studied areas due to environmental conditions of the area and laboratory. Values from 14,99 to 9,30  $\mu\text{gCO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  wet phase and 15,86 to 10,67  $\mu\text{gCO}_2\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$  on a dry basis was obtained. The result indicates that both methods are effective in determination of the carbon in soil microbial biomass.

**Keywords:** *CO<sub>2</sub>, soil respiration, SIR, dry phase, wet phase*

## INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema vivo, heterogéneo y dinámico que incluye componentes físicos, químicos, biológicos y sus interacciones. Por lo tanto, para evaluar su calidad resulta necesario la medición y descripción de sus propiedades (Luters & Salazar, 1999). Mundialmente se define la calidad como la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de un ecosistema natural o manejado, sustentar la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad del aire y del agua, y sostener la salud humana y el hábitat (Doran & Parkin, 1994). La calidad del suelo se evalúa midiendo un grupo de datos que corresponden a diversas propiedades edáficas (físicas, químicas y biológicas) (Vallejo, 2013).

El estudio del suelo ocupa la atención de profesionales de las ciencias agrícolas, ambientales, etc. Ya que para un uso, manejo y aprovechamiento sostenible del recurso suelo, es necesario conocer sus propiedades. Así como sus factores y procesos de formación (Vallejo, 2013).

Uno de los problemas más críticos a la hora de implementar políticas y programas fundamentados en el desarrollo sostenible es la selección idónea de indicadores de calidad de suelo que permitan evaluar el impacto de la implementación de diferentes prácticas de manejo agrícola y pecuaria. En la actualidad las propiedades biológicas se han convertido en criterios importantes para valorar el manejo o uso de los suelos, de tal forma que se crea la necesidad de orientar la producción agropecuaria hacia nuevas tecnologías fundamentadas en la recuperación de los suelos degradados a través de un manejo agroecológico sostenido que favorezca la biodiversidad (Vallejo, 2013).

La vida en el suelo es muy diversa, ya que abarca desde organismos microscópicos y unicelulares hasta animales grandes que cavan túneles. Los habitantes microscópicos no se encuentran aislados sino que forman parte de un medio ambiente muy complejo regulado por fuerzas naturales y en menor grado por la actividad del hombre, se puede comprender mejor la microbiología del suelo, si se ve al sistema del suelo como un todo dinámico, como un medio ambiente natural en el cual los microorganismos desempeñan una función esencial que puede resultar a veces poco entendida (Valencia, 2009).

La respiración del suelo es uno de los procesos más importante del ecosistema ya que está relacionado con factores como son la fertilización del suelo, productividad del

ecosistema, los ciclos del carbono que tienen participación en el cambio climático (Lou & Zhou, 2006). La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica del mismo y se pone en manifiesto después del desprendimiento del CO<sub>2</sub> ó el consumo de O<sub>2</sub> resultante del metabolismo de los organismos vivos existentes en el suelo. El CO<sub>2</sub> se produce por el metabolismo de la microflora y de las raíces de las plantas, siendo la descomposición microbiana de compuestos orgánicos el proceso más importante que lo genera (García et al., 2003).

Mediante la aplicación de algunos métodos como son la fumigación-extracción, fumigación-incubación, la respiración basal y la respiración por sustrato inducido se puede conocer la biomasa y la actividad microbiana a través de la respiración del suelo (Benedetti & Dilly, 2006).

Como se mencionó, existen varios métodos que permiten determinar la respiración del suelo, entre ellos: El método de respiración inducida por un sustrato (SIR) el cual utiliza la respuesta respiratoria inicial de microorganismos del suelo como sustrato para la obtención de una estimación de la cantidad de carbono (C) retenida en vivo. Este método se basa en el principio de que los microorganismos reaccionan a la adición de glucosa con una respuesta inmediata de la respiración que es proporcional a la biomasa (Hoper, 2006).

Otro de los métodos es la respiración Basal, se define como la respiración del suelo sin la adición de sustratos orgánicos al mismo. Es un parámetro ampliamente utilizado para determinar la actividad microbiana y el status de la MO del suelo (Anderson, 1982). Se calcula dividiendo el C-CO<sub>2</sub> liberado durante un experimento de respiración entre la duración del experimento (Pascual et al., 1999).

Al realizar una revisión bibliográfica, se ve que existe muy poco levantamiento de información que describan estudios sobre la respiración del suelo por sustrato inducido y respiración Basal en las zonas de nuestro estudio.

La importancia de comparar los protocolos de respiración del suelo, nos permiten medir la actividad microbiana y flujo de CO<sub>2</sub>, además teniendo en cuenta que los resultados obtenidos pueden ser utilizados para analizar la seguridad de los métodos, y así estandarizar un método seguro para brindar un mejor servicio.

En relación a la problemática descrita en el presente apartado se planteó los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

- Comparar los métodos: Basal y Respiración Inducida del Sustrato, para determinar el carbono de la biomasa microbiana en muestras de suelos.

### **Objetivos específicos**

- Conocer la respuesta microbiana con la adición de glucosa en muestras de suelos de dos ecosistemas diferentes en fase seca.
- Determinar el carbono de la biomasa utilizando el método Basal al primer y séptimo día de incubación en fase seca y fase húmeda.
- Evaluar el carbono de la biomasa durante dos periodos de tiempo utilizando el método BASAL y el método del SIR.

## **MARCO TEÓRICO**

### **CAPÍTULO 1**

## **Respiración del suelo**

El carbono entra en los ecosistemas terrestres a través de un único proceso, la fotosíntesis, pero se devuelve a través de una variedad de procesos, denominados colectivamente como respiración (Ryan & Law, 2005; Trumbore, 2006).

La respiración del suelo constituye un evento central de los cambios ecológicos globales debido a su papel controversial en los procesos de calentamiento global ya que puede determinar si un ecosistema dado se comporta como fuente o sumidero de CO<sub>2</sub> (Vásquez, 2013). También puede ser definida como la disminución de las concentraciones de oxígeno (O) en el suelo por el consumo realizado por la actividad biológica y al mismo tiempo el aumento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> debido a la respiración (Lojan, 2013).

Esta actividad metabólica se mantiene debido al equilibrio dinámico que existe entre las entradas de materia orgánica, procedente de la biomasa y las salidas por descomposición de la hojarasca y su eventual acumulación en el suelo (Schulze, 1967). La respiración edáfica juega un papel crítico en la determinación de un amplio rango de fenómenos ecológicos que van desde el funcionamiento individual de las plantas hasta la concentración global del CO<sub>2</sub> atmosférico (Liu et al., 2006). La respiración del suelo está regulada por una serie de factores bióticos y abióticos tales como la temperatura, el contenido hídrico, el inventario de nutrientes, la estructura de la vegetación, la actividad fotosintética o el desarrollo fenológico de la planta así como por la biomasa de raíces finas y microbiana (Adachi et al., 2006).

Los suelos son la mayor fuente y, a su vez, reservorio de carbono en los ecosistemas terrestres (Schelesinger, 1977; Raich, Potter & Bhagawati 2002), y son la vía principal por la cual el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), fijado por las plantas es retornado a la atmósfera (Schelesinger & Andrews, 2000).

Según Moreira & Siqueira (2002), la respiración es uno de los parámetros más antiguos para cuantificar la actividad microbiana. Ella representa la oxidación de la materia orgánica hasta la formación del CO<sub>2</sub> por organismos aeróbicos del suelo, que por lo tanto utilizan O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, hasta el CO<sub>2</sub>.

La respiración depende de muchos factores como la dinámica de la raíz, ciclos de nutrientes, (Raich & Schlesinger 1992; Lou & Zhou 2006), la temperatura, la humedad del suelo, la cantidad y calidad del sustrato Buchman (2000), la concentración de oxígeno, la biodisponibilidad de carbono, el pH (Krebs 2003; Pell et al., 2006), así



como también de los usos de la tierra, cobertura vegetal, mineralogía y prácticas de manejo (Mora, 2006).

## **Factores bióticos y abióticos que afectan la respiración del suelo**

### **Factores Bióticos**

Comprende todos los seres vivos existentes en un ecosistema, y las interrelaciones que se forman entre ellos, plantas, animales (incluido el hombre) y microorganismos.

Un ecosistema siempre involucra a más de una especie vegetal que interactúa con factores abióticos. La comunidad vegetal está compuesta por un número de especies que pueden competir unas con otras pero también pueden ser de ayuda mutua.

También existen otros organismos en la comunidad vegetal: animales, hongos, bacterias y otros microorganismos. Así que cada especie no solamente interactúa con los factores abióticos sino que está constantemente interactuando igualmente con otras especies para conseguir alimento, cobijo u otros beneficios mientras que compite con otras (e incluso pueden ser comidas) (Cruz, 2012).

### **Factores Abióticos**

Los factores que afectan el crecimiento de los microorganismos también influyen en la respiración en el mismo grado, los principales factores que afectan la respiración aerobia son: temperatura, oxígeno disuelto, humedad del suelo, pH y nutrientes (Chiriboga, 2008).

- Temperatura del suelo.- La temperatura cambia según la época del año, hora del día y profundidad, el calor del suelo proviene de dos fuentes: radiación solar y del universo ambas contribuyen en los cambios de la temperatura del suelo. Los cambios de estructura, contenido de humedad del suelo, color, la textura, la densidad, la porosidad, el porcentaje de materia orgánica, la fertilidad y la vida biológica del suelo, afectan básicamente en la temperatura del suelo (Rodríguez, 2004).
- Humedad del suelo.- Los suelos anegados tienen por lo general una menor tasa de respiración debido a que el agua ocupa los espacios porosos y el oxígeno atmosférico no puede penetrar rápidamente. Un exceso de agua por otro lado puede afectar el transporte y difusión de oxígeno hacia el interior de las partículas del suelo, creando condiciones anaerobias y reduciendo la respiración aerobia (Luo & Zhou, 2006).

- pH.- Es un parámetro que controla muchos procesos químicos, expresa la concentración de iones hidrógeno ( $H^+$ ) presentes en la solución del suelo, es muy importante en las propiedades del suelo porque: Regula las propiedades químicas del suelo, determina la disponibilidad del resto de los cationes para las plantas; influye sobre las propiedades biológicas del suelo, tanto las plantas como los microorganismos del suelo presentan un determinado intervalo de pH óptimo para su crecimiento, generalmente próximo a la neutralidad, varía entre 2 en suelos ácidos a 9 en suelos alcalinos. La producción de  $CO_2$  aumenta con el pH (Gomez, 2008).
- Nutrientes.- Los nutrientes son compuestos inorgánicos esenciales que constituyen un factor limitante para el crecimiento de las plantas, y otros no por ejemplo, el Nitrógeno, puede estar disponible pero sólo puede ser utilizado por la planta cuando se encuentra en forma de iones amonio ( $NH_4^+$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) (Rodriguez, 2004).

### **Métodos para determinar la respiración de suelos**

Existen varias metodologías para determinar la respiración de suelos, ya sea en el laboratorio o in situ. Los métodos utilizados son:

#### **Método de la respiración basal**

La determinación de la respiración basal del suelo se efectúa bajo las condiciones de incubación en laboratorio, sin la aplicación extra de nutrientes, bajo una temperatura constante ( $20-25\text{ }^{\circ}C$ ) y un contenido óptimo de agua en las muestras de suelos (aprox. 50-60 % del máximo de la capacidad de retención de agua) (Isermeyer, 1952; Alef 1991).

La humedad del suelo influye en la respiración del mismo a través del proceso fisiológico de las raíces y microorganismos, por lo que el óptimo de humedad de agua es por lo general cerca de la capacidad de campo. Cuando el contenido del agua del suelo es superior a las condiciones óptimas, la respiración del suelo está deprimida debido a la limitación de oxígeno.

Durante el periodo de incubación se mide la formación de bióxido de carbono ( $CO_2$ ), como también respectivamente el consumo de oxígeno ( $O_2$ ) (Jekinson, 1988).

La respiración basal se considera un parámetro útil en la medida de la actividad biológica del suelo. Se obtiene mediante el cociente entre el C- $CO_2$  emitido durante el

experimento de respiración, y el tiempo de duración del mismo. Con este parámetro se pretende conocer el estado biológico del suelo a partir del C-CO<sub>2</sub> desprendido en un tiempo determinado (Mogollón & Martínez, 2009).

La actividad microbiana del suelo puede ser estimada indirectamente en la determinación de la respiración Basal. Esta consiste en determinar la producción de O<sub>2</sub> en el medio o bien la concentración de CO<sub>2</sub> desprendido (función de la actividad biológica y del contenido del suelo en carbono orgánico fácilmente mineralizable), (Alef & Nannipieri 1995; García et al., 2003).

### **Método respiración por sustrato inducido (sir)**

El método SIR utiliza reacciones de respiración fisiológicas del organismo del suelo al sustrato. Además, como la producción de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub>, como un medio para cuantificar las actividades microbianas en los suelos. Este método fue desarrollado por Anderson & Domsch (1978) para proporcionar una estimación rápida de la biomasa de carbono de microorganismos que viven en los suelos.

Los niveles de producción y consumo se pueden medir inmediatamente después de la adición del sustrato para proporcionar una estimación de la biomasa microbiana del suelo de carbono (Sparling, 1995).

Este método puede ser llevado a cabo con bastante rapidez y tiene un tiempo de análisis de aproximadamente 1-3 horas, dependiendo del método utilizado para medir la respiración (Horwath & Paul, 1994).

Según Krebs (2003), la cantidad de CO<sub>2</sub> adsorbido es equivalente a la cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) consumido; la cantidad de NaOH inicialmente presente menos la cantidad remanente al final del período de incubación, se utiliza para computar la cantidad de CO<sub>2</sub> involucrado por el suelo, que entra en la solución y reacciona con el NaOH.

**CAPÍTULO 2**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Área de estudio**

Para desarrollar el presente proyecto se utilizó muestras de suelo de las zonas de Arenillas y Catamayo considerados como un solo Ecosistema, y la Estación Científica San Francisco como un Ecosistema diferente; esto debido a que los dos primeros sitios de muestreo de acuerdo a los criterios ambientales climáticos son secos (bosque seco) poseen bosque seco y el segundo ecosistema es húmedo bosque montano (Sierra et al,1999).

Las muestras pertenecen a un proyecto desarrollado en la UTPL con fines de investigación de bosques secos y montanos:

A continuación se describen las zonas de estudio.

- Catamayo: ubicado en el noroccidente de la provincia de Loja, su clima es subtropical con una temperatura media anual de 24,1 °C y un promedio anual de lluvias de 381 mm año<sup>-1</sup> (Guerrero, 2012).
- Arenillas: se encuentra al extremo sur del Ecuador (suroeste de la provincia de Loja), pertenece a la provincia de El Oro, su temperatura media anual es de 25,2 °C, La precipitación es de 540 mm año<sup>-1</sup> (Espinoza, 2012).
- Estación Científica San Francisco: se encuentra ubicada al oriente de la ciudad de Loja, en la provincia de Zamora Chinchipe, su clima es cálido húmedo con una temperatura de 15°C y precipitación promedio anual 2.000 mm año<sup>-1</sup> (Samaniego, 2015).

## **Metodología para la fase de laboratorio**

Para cumplir con los objetivos de este estudio se utilizó los métodos de respiración del suelo: Método Basal según la metodología de Isermeyer (1952) y el Método SIR descritos por Anderson & Domsch (1978).

## **Almacenamiento de las muestras**

La toma de muestras se realizó en temporada o periodo seco y húmedo, una vez colectadas se procedió a almacenar las muestras de la fase seca y húmeda en el refrigerador (4°C) para conservar su humedad. Posterior se tamizó las muestras con la ayuda de un tamiz < 2 mm para realizar los respectivos análisis de respiración de suelo.

## **Preparación de la muestra**

Una vez tamizadas las muestras de los diferentes sectores estudiados (Arenillas, Catamayo y Estación Científica de San Francisco) se procedió a:

**Limpieza de la muestra.-** Se realizó la eliminación de raíces, tallos, residuos de desechos, piedras a cada muestra antes de realizar el pesado correspondiente, que influirían en nuestros resultados.

**Sellado de las muestras.-** una vez colocados los reactivos, pesada la muestra y colocadas en los respectivos envases se procede a sellar las muestras con parafilm y sus tapas correspondientes para cada envase.

**Incubación de muestras.-** las muestras son incubadas a 25°C.

## **Determinación de la capacidad de campo del sustrato (CC)**

La capacidad de campo es una constante característica de cada suelo y depende fundamentalmente de la textura, cantidad de materia orgánica y grado de compactación de éste. La capacidad de campo representa el contenido de humedad del suelo.

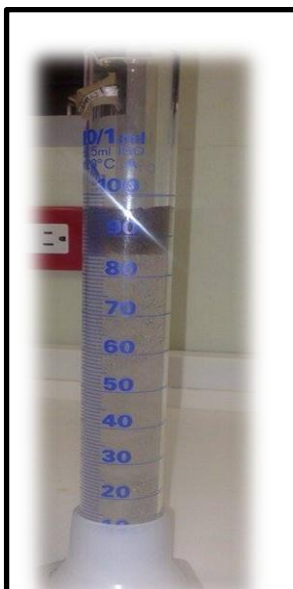
Para determinar la capacidad de campo se pesó 100 g de suelo de la muestra seca y tamizada, luego se colocó en una probeta de 100 ml, se registró el volumen ocupado por esta cantidad de suelo, se le añadió 5 ml de agua (gota a gota) en el centro y se tapó la probeta, luego de 24 horas se observó y anotó el volumen de suelo seco remanente, finalmente se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CC} = (V1 / (V1 - V2)) * (5 \text{ ml de H}_2\text{O}/100 \text{ g de suelo}) * 100 \text{ (ecuación 1)}$$

Dónde:

V1 = Volumen inicial (volumen ocupado por los g de suelo)

V2 = Volumen final (volumen que ha quedado sin humedecerse)



**Figura 1.** Análisis de capacidad de campo de las muestras de suelo.

**Fuente:** La Autora.

Del resultado de la ecuación 1 se obtuvo el 60 % de la CC (CC60 %), que es el porcentaje que se utiliza en esta metodología.

$$\text{CC60 \%} = (\% \text{ CC} * 60) / 100 \text{ (ecuación 2)}$$

### **Contenido de humedad**

Los recipientes fueron colocados en la estufa a 105 °C durante dos horas, después de este tiempo se los dejó en el desecador por 30 minutos; posteriormente, se tomó el peso del recipiente; sin encerrar la balanza se pesó aproximadamente 3 g de cada muestra de suelo húmedo, se anotó ese valor, luego se dejó durante 24 horas en la estufa a 105 °C, finalmente se las dejó en el desecador por 30 minutos y se volvió a tomar su peso.

La fórmula que se aplicó fue la siguiente:

$$\% \text{ H} = 100 * (\text{Ph} - \text{Ps}) / (\text{Ps} - \text{Pv}) \text{ (ecuación 3)}$$

Dónde:

Ph = Peso de la muestra húmeda

Ps = Peso seco a 105 °C

Pv = Peso de la vasija vacía

**Cantidad de agua para añadir a las muestras:** Luego de terminar con los análisis de capacidad de campo y contenido de humedad, se definió la cantidad de agua necesaria para agregar al suelo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ml H}_2\text{O a añadir} = (\text{g de suelo}) * (\text{CC60 \%} - \% \text{H}) / (\% \text{H} + 100) \text{ (ecuación 4)}$$

Dónde:

CC = Capacidad de campo

%H = Porcentaje de humedad

Un suelo alcanza la capacidad de campo cuando el agua que se pierde por gravedad ha sido drenada. Se usó este parámetro para tener un valor fijo de humedad en los ensayos.

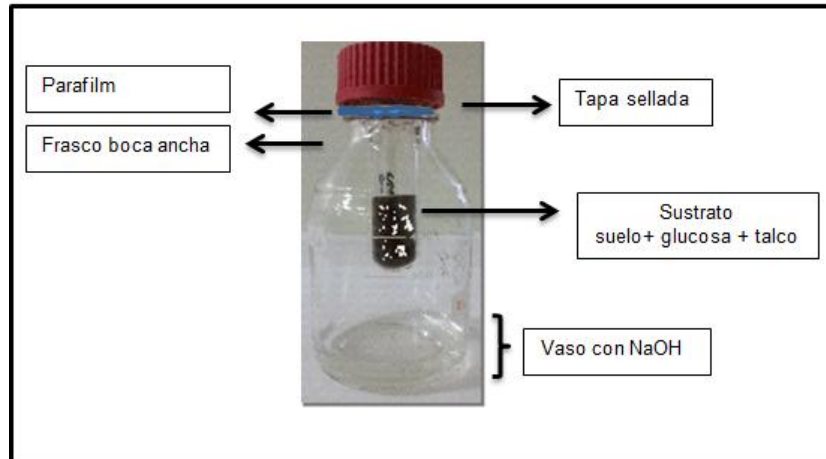
### **Método respiración inducida por el sustrato (sir)**

El principio del SIR se basa en la estimación de la respiración máxima inicial del suelo después de haber añadido al mismo en exceso un sustrato carbonado, generalmente como glucosa. La respiración se determina mediante la medida del desprendimiento de CO<sub>2</sub>. Anderson & Domsch (1978) encontraron que la glucosa produce los mejores resultados.

Luego de haber calculado la CC y el contenido de agua a adicionar a las muestras, se pesó 10 g de suelo fresco a capacidad de campo, y se mezcló con glucosa en relación 1:3 de glucosa más talco, se colocó esta mezcla en un vaso pequeño de plástico, junto con un frasco de vidrio (boca ancha) con 20 ml de (NaOH 0,05 M). Finalmente el frasco se selló herméticamente con parafilm y fue llevado a la incubadora Heraeus B6200, temperatura 70°C, 120v a 25 °C por un periodo de 5 horas (figura 2).

Para el desarrollo del SIR se realizaron varios blancos por cada 20 muestra de suelo.





**Figura 2.** Botellas de incubación para la determinación de la respiración del suelo por el método del SIR.

**Fuente:** La Autora.

Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la titulación, en donde, se añadió 2 ml de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$  0,5 M), esta mezcla se valoró con ácido clorhídrico (HCl 0.1M).

### Cálculos de los resultados

$$\text{CO}_2 \text{ mg/kg h} = [(\text{Vb} - \text{Vm}) * \text{N} * 6,6 * 1000] / (\text{Pm} * \text{t}) \text{ (ecuación 5)}$$

Dónde:

Vb = Valoración del blanco

Vm = Valoración de la muestra

N = Normalidad disolución de HCl 0,1

6,6 = Factor de conversión del NaOH

Pm =  $(\text{Peso de la muestra} * 100) / (100 + \text{CC60} \%)$

t = Tiempo de incubación

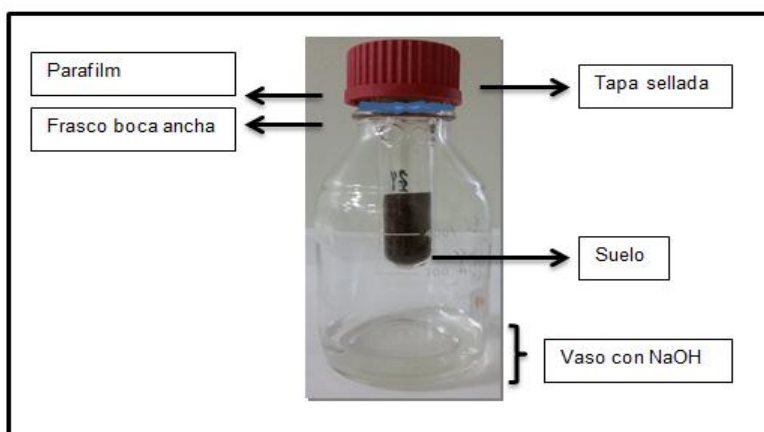
Para la presentación de los resultados se utilizó un factor de conversión de unidades y se los expresó en:  $\mu\text{g} \cdot \text{CO}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### MÉTODO BASAL

Su principio se basa en la incubación de muestras en condiciones óptimas (24 horas a 25 °C) en vasos herméticamente cerrados, donde el  $\text{CO}_2$  producido está siendo absorbido por el hidróxido de sodio y para calcular la evolución de este  $\text{CO}_2$  en la muestra se realiza una titulación con ácido clorhídrico.

Se utilizó 20 g de suelo fresco a capacidad de campo y se colocó en un vaso pequeño de plástico con orificios, este fue introducido en un frasco de vidrio (boca ancha) con 20 ml de (NaOH 0,05 M). Finalmente el frasco se selló herméticamente y fue llevado a la incubadora a 25 °C por un periodo de uno y siete días respectivamente.

Para el desarrollo del método Basal se realizaron varios blancos por cada 20 muestras de suelo para día uno y para día siete (figura 3).



**Figura 3.** Botellas de incubación para la determinación de la respiración del Suelo por el método Basal.

**Fuente:** La Autora.

Transcurrido este tiempo se procedió a realizar la titulación, en donde, se añadió 2 ml de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$  0,5 M), esta mezcla se valoró con ácido clorhídrico (HCl 0.1M).

### Cálculos de los resultados

$$\text{Mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} = ((C-S) \times 2.2 \times 100) / (SW \times \% \text{ dm}) \text{ (ecuación 6)}$$

Dónde:

C = Volumen gastado de HCl en el blanco.

S = Volumen gastado de HCl en la muestra.

2.2 = Factor de conversión (1ml de 0.1M HCL corresponde a 2,2 mg de  $\text{CO}_2$ ).

SW = Peso inicial en gramos (g).

100.  $\%^{-1}\text{dm}$ ) = Factor de materia seca del suelo.

## **Análisis estadístico**

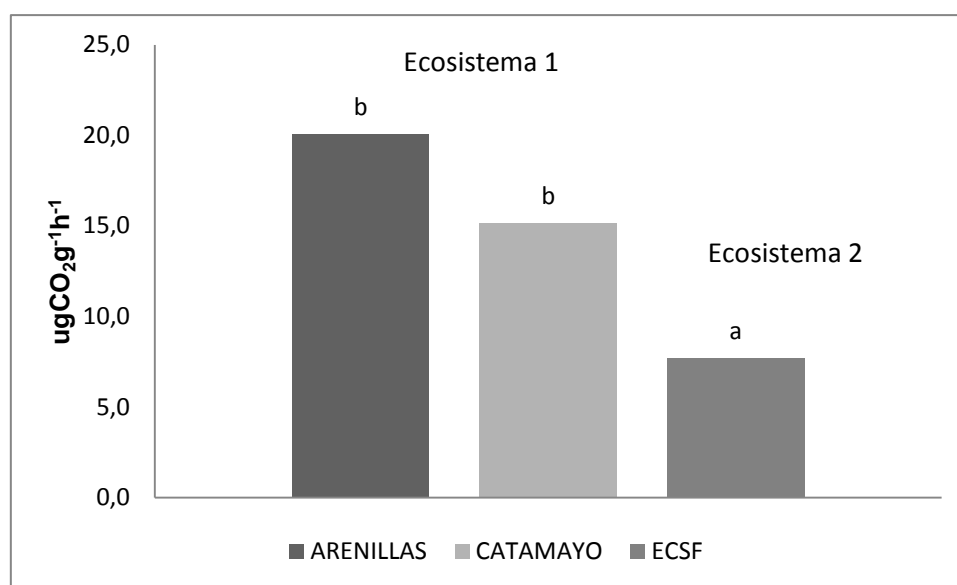
Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas no paramétricas, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y por otra parte se aplicó la prueba de Tukey Subconjuntos homogéneos ( $p < 0.05$ ) para comparar las medias y ver si existe diferencias estadísticas significativas. Para ello se utilizó el programa SPSS 20.0.

**CAPÍTULO 3**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Resultados y discusión del objetivo 1:** Conocer la respuesta microbiana con la adición de glucosa en muestras de suelos de dos ecosistemas diferentes en fase seca.

### Determinación de la respiración microbiana

Después de ejecutado el experimento, fundamentado en el método de Sustrato Inducido, propuesto por Anderson & Domsch (1978), a las cinco horas de incubación se obtuvieron los siguientes resultados para los dos ecosistemas en estudio: 1) Arenillas y Catamayo y 2) Estación Científica San Francisco, como se indica en la (figura 4).



**Figura 4.** Promedio de respiración inducida por el sustrato SIR, realizado en fase seca.  
**Fuente:** La Autora.

En la figura 4, los datos expuestos al determinar el carbono de la biomasa utilizando el método de respiración inducida por el sustrato indican que los flujos totales de CO<sub>2</sub> son mayores en el ecosistema 1, obteniendo resultados en la zona de Arenillas con 20,04 ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y de Catamayo con 15,13 ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, los que no muestran diferencia estadística entre sí; sin embargo se puede apreciar que este ecosistema indica una diferencia estadística significativa frente al ecosistema 2 de La Estación Científica San Francisco, el que emite menor respiración de CO<sub>2</sub> desde el suelo con 7,71 ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

Todo proceso o procedimiento en laboratorios desempeñan un papel muy importante en el cálculo de respiración del suelo, es así que se debe considerar los tiempos adecuados al realizar cada paso del método; un error aquí podría afectar seriamente a la medición del flujo o respiración del suelo. Según (Anderson & Domsch 1978;

Sparling, 1995) dice que niveles de producción y consumo se pueden medir después de la adición del sustrato (de dos a ocho horas) para proporcionar una estimación más exacta de la respiración del suelo, lo mencionado por este autor ha sido aplicado en este trabajo, en el que como ya se ha indicado las mediciones por el método SIR se realizaron a las cinco horas después de la adición del sustrato (glucosa). En otro estudio de Anderson & Domsch (1978), ellos observaron que la emisión de CO<sub>2</sub> no era uniforme durante las 6 horas siguientes a la adición de glucosa, añadiendo que las variaciones son mínimas, dato que coincide con los resultados de este trabajo, en el que el flujo de CO<sub>2</sub> en las primeras cinco horas, también se observó que la variabilidad fue mínima.

En estudios realizados por Albiachet (2000) de respiración del suelo mediante el método SIR reportó valores de respiración del suelo de entre 6,7 - 43,4 ul C-CO<sub>2</sub>g suelo<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, estos resultados concuerdan con los valores obtenidos en el presente trabajo, en los que se encontró valores de 7,71 – 20,04 ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> después de la adición de glucosa en incubación en los dos ecosistemas estudiados. Por lo que se puede indicar que en este caso la aplicación del método SIR tiene un funcionamiento correcto.

Las pequeñas diferencias encontradas en la respiración del suelo de estos dos Ecosistemas, posiblemente se deban a las características propias en climas y suelos de las zonas de muestreo. Por una parte se tiene que el Ecosistema de Arenillas y Catamayo presentan temperaturas medias anuales de entre 24 a 25,2 °C, humedad ambiental de alrededor del 60% y precipitaciones anuales que van desde 381 mm año<sup>-1</sup> en Catamayo y 540 mm año<sup>-1</sup> en Arenillas (Guerrero, 2012); mientras que las características del ecosistema de la Estación Científica San Francisco, presenta temperaturas más bajas de 15 °C, humedades más altas de 90 % y precipitaciones de 2.000 mm año<sup>-1</sup> (Samaniego, 2015). Según Ramírez & Moreno (2008), indican que los factores ambientales como la humedad y la temperatura ambiente y del suelo ejercen un control importante sobre las tasas de emisión de CO<sub>2</sub>; así mismo Moreira & Siqueira (2006), considera que los cambios ambientales permiten que las especies de micro fauna existentes en el suelo se adapten, se reemplacen o den lugar a la aparición de nuevas especies por lo que la respiración del suelo puede verse afectada; lo mencionado por estos autores podría estar ocurriendo en los ecosistemas de estudio (Catamayo, Arenillas y San Francisco). Por una parte la mayor respiración en el ecosistema de Catamayo y Arenillas podría deberse a factores específicos como la humedad, ya que es conocido que a humedades de 60 % la actividad biológica del

suelo es mayor, lo que provocaría una mejor respiración del suelo; mientras que la alta humedad y precipitaciones del ecosistema de San Francisco (90% y 2.000mm año<sup>-1</sup>) puede estar afectando de manera negativa a la respiración del suelo. Además el tipo de vegetación existente podría ser otro factor que afecte la respiración, en Arenillas y Catamayo, la presencia de arbustos (Bosque seco provisto de vegetación arbustiva) con raíces y raicillas pequeñas, estaría ayudando a una mejor circulación del aire en el suelo, por lo que mejorará la aireación del suelo, dando a los microorganismos las condiciones necesarias para una mayor actividad biológica y por lo tanto mayor respiración; mientras que en el ecosistemas de San Francisco, al presentar vegetación arbórea de mayor tamaño (Bosque Montano) y mayores humedades, la respiración del suelo se verá afectada de forma negativa. Esto coincide con lo indicado por González (2009), que la existencia de una gran cantidad de raicillas en la capa superior edáfica ayuda a una buena circulación del aire en el suelo y por ende a una mayor respiración.

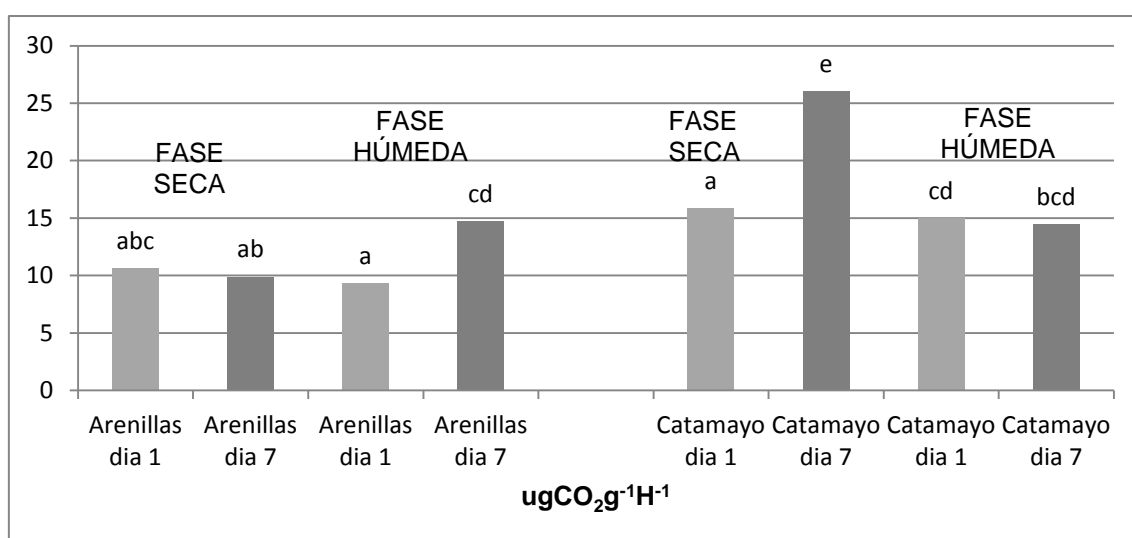
Otro factor influyente serían las características de los suelos de cada ecosistema. Por ejemplo Martin-Olmedo & Ress (1999) indican que en un estudio de emisiones de flujos de CO<sub>2</sub> la materia orgánica apoya a procesos de actividad biológica, por lo que la respiración de suelo se ve aumentada, sin embargo cabe mencionar que para que esto se cumpla, todas las condiciones de ambiente (precipitación, temperatura y humedad) y suelo (pH, nutrientes, humedad, temperatura y microorganismos) deben ser adecuados. Sin embargo en este estudio a pesar de tener contenidos más altos de materia orgánica en la ECSF (9,31 %) frente a Arenillas y Catamayo (4,95 y 3,13 respectivamente) presenta valores más bajos de la respiración del suelo, esto puede explicarse porque el pH de la ECSF es de fuertemente ácido a extremadamente ácido promedio 3,50), en cambio en Arenillas y Catamayo presentan suelos de ligeramente ácidos a ligeramente alcalinos (7,45 - 5,3 respectivamente ) y en pH que van alrededor de la neutralidad se puede encontrar mayor actividad biológica.

El termino pH define la acidez y basicidad relativa de una sustancia (en este caso suelo). Un valor de pH 7.0 es neutro, los valores menores a 7.0 son ácidos y los superiores a 7.0 son básicos. La importancia del pH radica en que los nutrientes del suelo y los organismos biológicos transforman los minerales para que sean disponibles en la solución del suelo, en un rango de pH adecuado (Von-Uexkull, 1986).

**Resultados y discusión del objetivo 2** Determinar el carbono de la biomasa utilizando el método basal al primer y séptimo día de incubación en fase seca y fase húmeda.

Para este objetivo se trabajó en un solo ecosistema (Catamayo y Arenillas), utilizando el método BASAL, tanto en fase seca como en fase húmeda; es importante mencionar que por no contar con muestras suficientes del ecosistemas 2 (Estación Científica San Francisco) no sé realizó los análisis de respiración de suelo correspondientes a esta zona.

En la figura 5 se observa los resultados de la respiración de suelos fase seca y fase húmeda al día uno y día siete de las zonas de estudio. En la zona de Arenillas se puede apreciar que no existe diferencia estadística entre día uno y siete de la fase seca mientras que en la fase húmeda se puede apreciar mayor respiración del suelo en el día siete, indicando diferencia estadística frente al día uno. Por otra parte en la zona de Catamayo podemos ver que la respiración del suelo en fase seca es mayor en el día siete indicando diferencia significativa frente a Catamayo día uno, y en fase húmeda no se observa diferencia estadística entre día uno y día siete.



Arenillas S1= Arenillas fase seca día 1, Arenillas S7= Arenillas fase seca día 7, Arenillas H1= Arenillas fase húmeda día 1, Arenillas H7= Arenillas fase húmeda día 7, Catamayo S1= Catamayo fase seca día 1, Catamayo S7= Catamayo fase seca día 7, Catamayo H1= Catamayo fase húmeda día 1, Catamayo H7= Catamayo fase húmeda día 7.

**Figura 5.** Respiración método basal día uno y día siete incubación.

**Fuente:** La Autora.

Comparaciones con otros estudios en donde se aplica el método basal para medir la respiración del suelo, se puede encontrar que existen cambios estadísticos significativos, estos resultados concuerdan con los nuestros figura 5. Según Moreira & Siqueira (2002) indican que la respiración del suelo es variable, tanto espacialmente



como estacionalmente, y está fuertemente afectada por condiciones de humedad y temperatura. Un incremento de 10 °C a partir de temperaturas 30 a 35°C, puede duplicar la respiración y crecimiento de las bacterias. Lo cual puede estar ocurriendo en el estudio, en los diferentes días de medición y fases (seca y húmeda) que las diferencias de respiración en los suelos probablemente se deban a las características específicas de cada zona.

Es así, que en este caso en la zona de Arenillas en fase seca la respiración del suelo indica valores similares entre día uno y siete, porque existe mayor tiempo de incubación y posiblemente mayor actividad biológica mientras en fase húmeda las emisiones de la misma zona el día siete presenta mayor respiración del suelo, la posible explicación es de que la actividad microbiana aumentó por las variables climáticas del día de muestreo, como por ejemplo la temperatura y contenido de humedad del suelo; Jones et al., (2005) comenta que las altas temperaturas registradas en la fecha de muestreo puede causar una variación en la emisión de CO<sub>2</sub> desde el suelo. Otra posible explicación a lo que sucede con la respiración del suelo de esta zona es que hubo menor respiración debido al bajo contenido de humedad en el día de muestreo en fase seca, ya que esto priva a los microorganismos del agua necesaria para su metabolismo y por lo tanto disminuye su actividad, no obstante los datos obtenidos de respiración no indican mayor rango de variación entre fase y día.

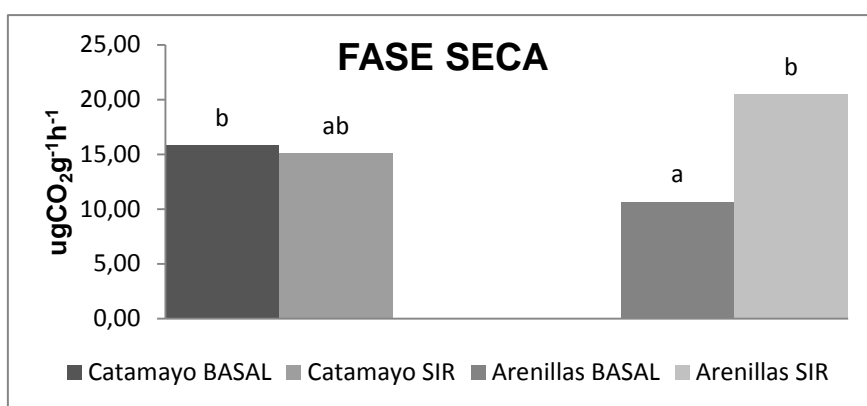
Por otra parte en la zona de Catamayo se observa lo contrario, en fase seca hay mayor respiración al día siete frente al día uno, porque existe mayor tiempo de incubación y posiblemente mayor actividad biológica mientras en fase húmeda la respiración del suelo es similar, lo cual se atribuye a las características propias de la fase, zona y día de muestreo ya que estos factores o variables influyen directamente en la respiración del suelo. Kitzler et al. (2006) midió las tasas más altas de emisión de CO<sub>2</sub> durante el verano e invierno, indicando resultados de mayor flujo de CO<sub>2</sub> en el periodo de verano, lo cual coincide con lo ocurrido en la zona de Catamayo que en fase seca hay mayor respiración del suelo.

Por ejemplo realizando una comparación de este estudio con el estudio de Castillo (2011) el cual fue realizado en Nicaragua, el indica valores de 0,49 – 7.5 ugCO<sub>2</sub>g suelo h<sup>-1</sup>, mientras que los valores de este estudio (Zonas de Catamayo y Arenillas) presentan una respiración mínima de 9,30 y máxima de 26,00 ugCO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> en las diferentes fases y días de análisis; estas variaciones con este estudio u otro estudio de respiración de suelos van a presentar las variaciones debido a las singularidades de cada lugar de estudio, especialmente al clima, microclima, características del suelo,

cantidad de fauna y micro fauna del suelo; haciendo énfasis en este último punto podemos ver que una alta tasa de respiración microbiana no necesariamente significa un resultado positivo, ya que si el sistema evaluado no tiene un aporte adecuado de nutrientes, puede ocurrir pérdida de C que lleve a un empobrecimiento del mismo (Atlas & Bartha, 2002) , por lo que nuevamente se indica que la respiración del suelo depende de muchos factores.

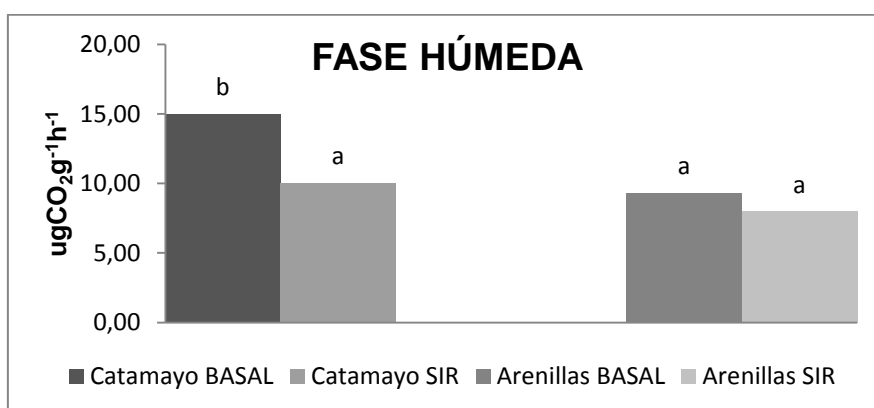
**Resultados y discusión del objetivo 3:** Evaluar el carbono de la biomasa durante dos periodos de tiempo utilizando el método BASAL y el método del SIR.

La figura 6 muestra los valores que se obtuvieron en la comparación de los dos métodos utilizados en fase seca. Los resultados indican que en Catamayo el método BASAL y SIR no muestran diferencia estadística entre los dos, mientras que la comparación de métodos en la zona de Arenillas se ve diferencia estadística, sin embargo se puede indicar que la diferencia entre los dos métodos es muy bajo ( $9,85 \mu\text{gCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ).



**Figura 6.** Respiración del suelo por los método Basal y SIR fase seca.  
**Fuente:** La Autora.

Por otra parte en la figura 7 se muestra los valores que se obtuvieron en la comparación de los dos métodos utilizados en fase húmeda, pudiéndose observar que en la zona de Catamayo los métodos indican diferencias estadística, sin embargo esta diferencia también es baja ( $4,99 \mu\text{gCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), mientras en la zona de Arenillas no se observa diferencia estadística en la comparación de los métodos.



**Figura 7.** Respiración método basal y método SIR fase húmeda.  
**Fuente:** La Autora.

En este estudio los dos métodos empleados proporcionan resultados confiables y aproximados entre ellos, lo que indica que se pueden emplear para el análisis de la respiración del suelo. Sin embargo Anderson & Domsch (1978) encontraron que la glucosa produce los mejores resultados de respiración del suelo para proporcionar una estimación rápida de la biomasa de carbono de microorganismos que viven en los suelos (Método SIR). La principal ventaja del método SIR es su rapidez, ya que podemos obtener datos de la biomasa microbiana a cinco horas de incubación; por otro lado no se utilizan reactivos tóxicos y tiene bajo coeficiente de variación, este método puede ser aplicado en suelos de pH bajo (<6). No obstante, la respiración del suelo es altamente variable y puede presentar amplias fluctuaciones naturales dependiendo del substrato disponible, humedad, temperatura, etc. (Brookes,1996).

En este sentido nuevamente se atribuye las variaciones de respiración del suelo a las características climáticas del suelo mismo. Es así que la disminución de la humedad del suelo afecta adversamente la actividad biológica y respiración de los suelos, la respiración de los suelos terrestres comúnmente está entre el 60 – 80% de la capacidad de retención de humedad, a este contenido de humedad el suelo presenta un contenido de agua suficiente para la actividad microbiana correcta; estas variaciones se darán independientemente del método aplicado para medir respiración del suelo, por lo que la aplicación de un método u otro posiblemente no mejorará o dará un resultado mejor.

Como podemos observar en las figuras 6 y 7, el contenido de carbono de la biomasa microbiana mostró variaciones en algunos casos, mientras que en otros no, esto se puede atribuir a lo explicado por Guntiñas (2010), que a mayor temperatura de incubación, mayor es la actividad respiratoria para todas las humedades; las temperaturas de incubación en los dos métodos usados en este trabajo fueron a 25 °C, sin embargo una posible variación de temperatura así sea mínima pudo afectar la respiración del suelo en uno u otro método, lo cual podría haber ocurrido en este ensayo y mostrar la ligera variación entre métodos.

La respiración de suelos del método SIR están acordes a valores encontrados por Albiachet (2000), el reportó valores de respiración del suelo de entre 6,7 - 43,4  $\mu\text{CO}_2\text{g suelo}^{-1} \text{h}^{-1}$ , mientras que en este estudio van desde 7,9 a 20,5  $\mu\text{gCO}_2\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , lo cual nos indica que el método está funcionando de una manera adecuada. Sin embargo también hay que considerar que las variaciones obtenidas se deben a una serie de factores ambientales. Como por ejemplo lo comentado por Ramírez & Moreno (2008) lo que señalan que los factores ambientales como la humedad y la temperatura del

suelo ejercen un control importante sobre las tasas de emisión de CO<sub>2</sub>. En general, la acumulación de carbono es mayor en suelos muy húmedos ya que la descomposición está restringida por altos valores de humedad, sin embargo esto es solo un factor para que aumente la respiración del suelo. Según Guntiñas (2010) el contenido de humedad del suelo, la emisión de CO<sub>2</sub> o respiración del suelo varía aumentando o disminuyendo.

Al comparar nuestros datos obtenidos con el método basal con los de Carter (1991) en diferentes tipos de suelos, el autor reporta valores de 2 - 20 ugCO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, lo que coincide con este estudio, en el que se obtiene valores de respiración del suelo que van desde 9,30 – 14,99 ugCO<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, lo cual es indicativo que el método está funcionando de manera correcta, así mismo atribuyendo las variaciones mínimas a las condiciones de clima y suelo. Mier & Kress (2000) dice que las variaciones climáticas tanto como en la temperatura y en la humedad del suelo explican satisfactoriamente la variación dadas de la respiración del suelo. Por otra parte en otro estudio realizado en Ecuador provincia de Zamora Chinchipe por Chiriboga (2008) con el método Basal encontró que en zonas con pastos activos la respiración del suelo fue de 0,40 µg CO<sub>2</sub>m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> a 0,54 µgCO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, los datos obtenidos por este autor son menores a los resultados en este estudio, atribuyendo así mismo a las diferencias de las variables de clima, suelo y vegetación. Además cabe mencionar que las variaciones también suelen ocurrir debido a las condiciones del análisis de las muestras en el laboratorio.

## CONCLUSIONES

- La respuesta microbiana con la adición de glucosa (Método SIR) presentó mayor actividad en las muestras del ecosistema 1 (Arenillas y Catamayo), indicando mayor respiración del suelo que en el ecosistema 2 (Estación Científica San Francisco). Atribuyendo esta variación a las características del pH de los suelos de cada ecosistema, además las variables de temperatura y humedades tanto del suelo y del ambiente estaría haciendo que la actividad microbiana actué de manera distinta y por lo tanto provoquen estas diferencias de respiración entre los suelos.
- La aplicación del método BASAL al comparar las dos zonas del ecosistema 1 (Arenillas y Catamayo) y en diferentes periodos de tiempo (día uno y siete), indican diferencias menores en la respiración de los suelos de las dos zonas, Se puede comentar que su comportamiento no sigue un patrón específico de respiración según la fase o el día de análisis; estas mínimas diferencias probablemente se deban a variaciones de temperatura, humedad, muestreo en campo y temperatura de incubación en el laboratorio.
- Al analizar los métodos Basal y SIR se concluye que los dos son eficaces al realizar los análisis de respiración del suelo, indicando que el método SIR es más rápido y menos costoso, mientras que el Método Basal emplea mayor tiempo de incubación.

## RECOMENDACIONES

- Analizar las muestras de suelo conforme sean tomadas para evitar que el suelo quede almacenado por mucho tiempo en el congelador.
- Tener cuidado con el uso de materiales y equipos de laboratorio, especialmente asegurarse que estén bien limpios para evitar la reacción con otros reactivos que puedan alterar los resultados.
- Los reactivos utilizados deben ser preparados en el día, para obtener mejores resultados.
- Tener cuidado al incubar las muestras de suelo a la temperatura adecuada ya que un aumento de la misma puede causar variación los resultados de respiración del suelo.
- Considerar en futuros estudios incluir la toma de datos para análisis de variables de clima y suelo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, M., Bekku, W., Okuda, T., & Koizumi, H. (2006). Differences in soil respiration between tropical ecosystems. *Applied Soil Ecology* 34: 258-265.
- Albiachet, R. (2000). Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Biores tech* 75:43- 48.
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic press, San Diego p 576.
- Anderson, J & Domsch, K. ((1978)). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. p.58.
- Atlas, R. & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: pp 250-261.
- Benedetti, A. & Dilly, O. (2006). *Microbiological methods for assessing soil quality*. London: UK, CABI. p 3-14.
- Brookes, P. (1996). The use of microbiological parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and fertility of soils* 269-279.
- Buchman, N. (2000). Biotic and abiotic factors controlling soil respiration rates in *Picea abies* stands. *Soil Biology* 32: 1625 - 635.
- Carter, M. (1991). Ninhydrin- reactive N released by the fumigation- extraction method as a measure of microbial biomass under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 837-842.
- Castillo, X. (2011). *Determinación de los indicadores biológicos de suelos agrícolas*. Leon.
- Chiriboga, C. (2008). *Medida de la respiración del suelo y determinación de biomasa en zonas de pastos activos y pastos abandonados*. Loja - Ecuador: Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario.
- Cruz, P. (2012). *La contaminación de la vertiente del Dique influye en la localidad de San Antonio de Ibarra*. Ibarra.
- Doran, J., & Parkin, T. (1994). *Defining and assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America: pp 3-21.
- Espinoza, C. (2012). *Estructura y funcionamiento de ecosistemas secos del Sur de Ecuador*. Madrid.
- García, C., Gil, F., Hernández, T. & Trasar, C. (2003). *Técnica de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España, : Mundi-prensa.



- Gomez, S. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan biorremediación por pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos.
- Gonzalez, N. (2009). Respiración de suelo por sustrato inducido en un bosque. Loja.
- Guerrero, V. (2012). propuesta de una red de monitoreo para determinar la calidad del agua del río Guayabal, en su paso por el poblado de Catamayo. Loja.
- Gutiérrez, M. (2010). Influencia de las temperaturas y de la humedad en la dinámica de la materia orgánica de los suelos y su relación con el cambio climático. Santiago de Compostela.
- Hoper, H. (2006). Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. London: p 117-126.
- Horwath, W. & Paul, E. (1994). En Methods of soil analysis Part 2 Microbiological and Biochemical Properties SSSA Wisconsin.
- Isermeyer, H. (1952). Eine einfache methode zur bestimmung der Bodenatmung und der karbonate im boden. Soil. Sci 56: 1-3 .
- Jekinson, D. (1988). Determination of microbial biomass nitrogen and carbon in soil. Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural, p 369-386.
- Jones, S., Rees, R. & Skiba, U. (2005). Greenhouse gas emissions from a managed grassland. Global and Planetary Change, 47: 201-211.
- Kitzler, B., Zechmeister-Boltenstern, S., Holtermann, C., Skiba, U., & Butterbach-Bahl, K. (2006). Nitrogen oxides emission from two beech forests subjected to different nitrogen loads. Obtenido de <http://www.biogeosciences.net/3/293/2006/>
- Krebs, L. (2003). Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura: I. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono. Guayaquil, Ec, ESPOL: Tesis Mag. Sc. 67 p.
- Liu, H., Han, X., Huang, J., Sun, J., & Wang, H. (2006). Respiratory substrate availability plays a crucial role in the response of soil respiration to environmental factors. Applied soil Ecology 32: 248 - 292.
- Lojan, C. (2013). Respiración microbiana y prueba de fitotoxicidad de tres abonos orgánicos elaborados en la Estación Agroecológica. UTPL.
- Luo, Y. & Zhou, X. (2006). Soil respiration and the environment. Estados Unidos: Elsevier 316p.
- Luters, J. & Salazar, J. (1999). Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo. Buenos Aires: United States Department of Agriculture: P 88.

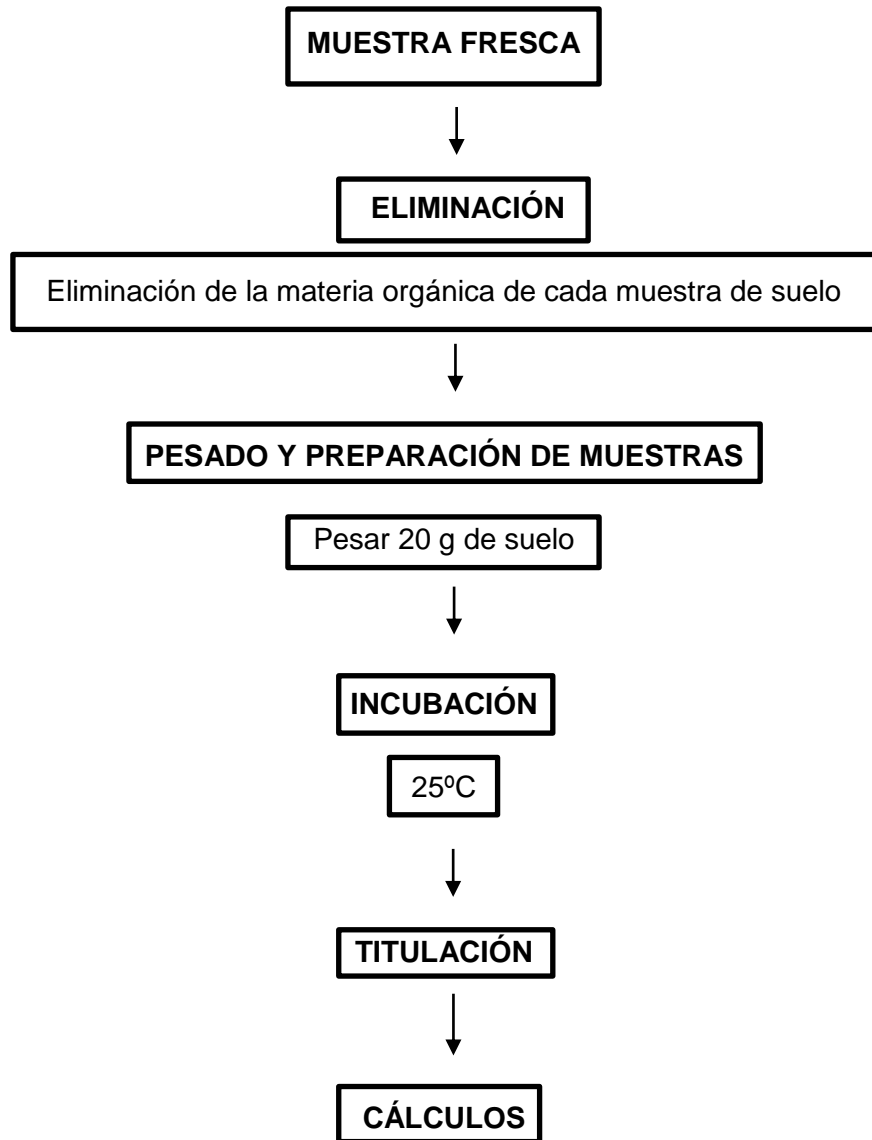
- Martin- Olmedo, P. & Ress, M. (1999). Short-term N availability in response to dissolved-organic-carbon from poultry manure, alone or in combination with cellulose. *Soil, Fertil Soil* 29: 386-393.
- Mier, C. & Kress, L. (2000). Soil CO<sub>2</sub> evolution and root respiration in 11 year old loblolly plantations as affected by moisture and nutrient availability. 347-359.
- Mollogon, J. & Martinez, A. (2009). Variación de la actividad biológica del suelo en un transecto altitudinal de la sierra de San Luís . Estado Falcón.
- Mora, J. (2006). La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Recuperado el 20 de Abril de 2014, de [http://lunazul.ucaldas.edu.co/index2.php?option=com\\_content&task=view&id=223](http://lunazul.ucaldas.edu.co/index2.php?option=com_content&task=view&id=223) &l
- Moreira , M. & Siqueira , J. (2002). Microbiología y Mircobiología del suelo. Brasil: UFLA.
- Moreira, M. & Siqueira, J. (2006). Soil organisms in Tropical Ecosystems: a key role for Brazil in the global quest for the conservation and sustainable use of biodiversity. London, UK CABI p 1-12.
- Pascual, J., Garcia, C. & Hernandez, T. (1999). Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal soild waste to an arid soil. *soils* 30:1-6.
- Pell, M., Stenstrom, J. & Granhall, U. (2006). Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. London: p. 117- 126.
- Raich, J. & Schelesinger, W. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relation to vegetation and climate. *Tellus*. 44B: 81- 99.
- Raich, J., Potter, C. & Bhagawati, D. (2002). Interannual variability in global soil respiration. *Global Change Boil.* 8: 800-812.
- Ramirez, A. & Moreno, F. (2008). Respiración Microbial y de raíces em suelos de Bosques Tropicales Primários y Secundários. Colombia , 61 : 4381- 4393.
- Research, W. (1997). Guide to solvita testing and managing your soil. Woods and Research Labortory, Mt. Vernon, ME.
- Rodriguez, M. (2004). Meteorología y Climatología.
- Ryan, M. & Law, B. (2005). Interpreting, measuring, and modeling soil respiration. *Biogeochemistry* p 73: 3-27.
- Sierra, R. (1999). Propuesta preliminar de un sistema de clasificacion de vegetacion para el Ecuador Continental. Quito: EcoCiencia - GEF.
- Schelesinger, W. (1977). Carbon balance in terrestrial detritus. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 8:51-81.

- Schelesinger, W. & Andrews, J. (2000). Soil respiration and the global carbon cycle. *Biochemistry* 48: 7-20.
- Schulze, E. (1967). Soil respiration of tropical vegetation types. *Ecology* 48: 652- 653.
- Samaniego, M. (2015). Estudio de efecto de la adición sostenida de nitrógeno sobre la diversidad microbiana del suelo en el bosque montano del Sur del Ecuador .
- Sparling, G. (1995). El método inducido sustrato respiración. pp. 397-404.
- Tumbore, S. (2006). Carbon respired by terrestrial ecosystems - recent progress and challenges. *Global Change Biology*.
- Valencia, C. (2009). *Bioquímica de suelos* . Mexico.
- Vallejo, V. (2013). Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano. Bogotá- Colombia: 21 - 38 pp.
- Vásquez, J. (2013). Respiración del suelo según su uso y su relación con algunas formas de carbono en el Departamento del Magdalena, Colombia. *Bioagro* volumen 25.
- Von Uexkull, H. (1986). Efficient fertilizer use in acid upland soils of the humid . Rome: Food and agriculture organization of the united nations.
- Wilson, H. & Al- Kaisi, M. (2008). Crop rotation nitrogen fertilization effect on soil CO<sub>2</sub> emissions in central Iowa. Elsevier, *Applied soil Ecology* 39: 264-270.

## **ANEXOS**

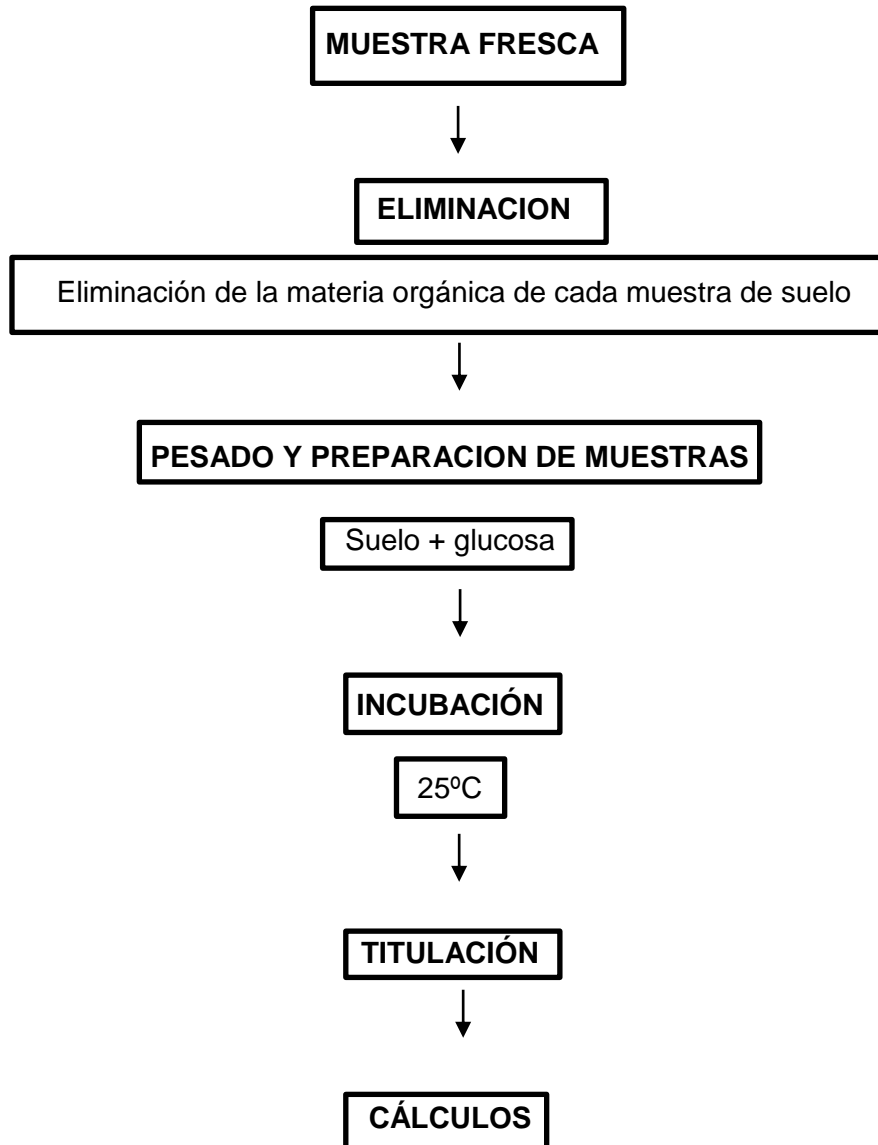
## Anexo 1

Proceso de flujo para el método basal en el laboratorio.



## Anexo 2

Proceso de flujo para el método del SIR en el laboratorio.



### Anexo 3

#### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA EL MÉTODO DE RESPIRACIÓN INDUCIDA POR EL SUSTRATO SIR

- a) **Hidróxido de sodio 0,05M (NaOH).**- se pesó 2 g de hidróxido de sodio, se los disolvió en agua destilada, y se aforó a 1000 ml.
- b) **Ácido clorhídrico 0,1M (HCL).**- se tomó 4,5ml de ácido clorhídrico (se usó las cámaras extracción y equipo de protección ya que desprende olores fuertes y tóxicos), se disolvió en agua destilada, y se aforo a 500ml
- c) **Clorhidrato de Bario 0,5M (BaCl<sub>2</sub>).**-se pesó 10 g de clorhidrato de bario y se aforó a 100 ml con agua destilada.
- d) **Fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>).**-se pesó 0,1g de fenolftaleína y se diluyo en 60ml de alcohol y se aforo a 100ml con agua destilada.
- e) **Glucosa en forma sólida.**-se mezcló glucosa más talco en relación 1:3

Reactivo	Fórmula
Hidróxido de sodio	NaOH
Ácido clorhídrico	HCL
Clorhidrato de Bario	BaCl <sub>2</sub>
Fenolftaleína	(C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> )
Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>

#### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA EL MÉTODO DE RESPIRACIÓN BASAL

- a) **Hidróxido de sodio 0,05M (NaOH).**-se pesó 2 g de hidróxido de sodio, se los disolvió en agua destilada, y se aforó a 1000 ml.
- b) **Ácido clorhídrico 0,1M (HCL).**-se tomó 4,5ml de ácido clorhídrico (se usó las cámaras extracción y equipo de protección ya que desprende olores fuertes y tóxicos), se disolvió en agua destilada, y se aforó a 500ml.

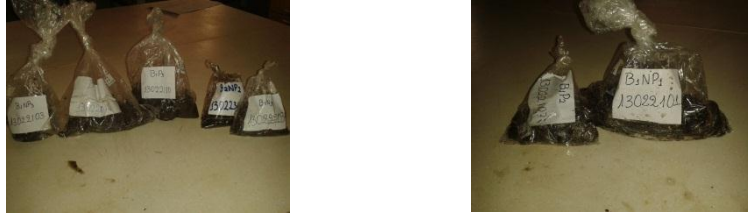
- c) **Clorhidrato de Bario 0,5M (BaCl<sub>2</sub>).**-se pesó 10 g de clorhidrato de bario y se aforó a 100 ml con agua destilada.
- d) **Fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>).**- se pesó 0,1g de fenolftaleína y se diluyo en 60ml de alcohol y se aforo a 100ml con agua destilada.



## Anexo 4

### Fase de laboratorio Método SIR

**Figura 8.** Muestras del suelo de Catamayo – Arenillas – ECSF.



**Figura 9.** Pesado de glucosa + talco.



**Figura 10.** Incubación a 25 °C .

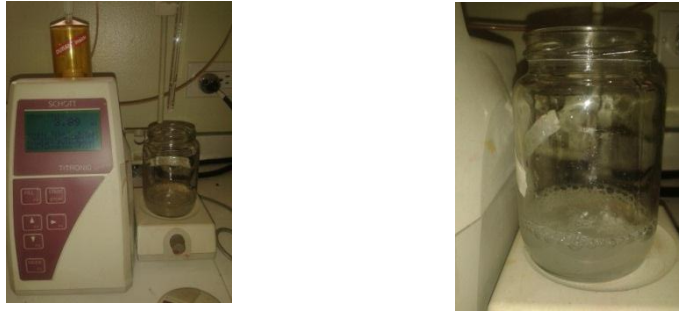


ANTES DE LA TITULACIÓN



**Figura 11.** Vertido del contenido de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  con fenolftaleína.

## DESPUES DE LA TITULACIÓN



**Figura 12.** Determinación del nivel de respiración.

## Anexo 5

### Fase de laboratorio Método Basal

Figura 13. Muestras del suelo de Catamayo – Arenillas.



Figura 14. Pesado de las muestras.



Figura 15. Incubación a 25° C.

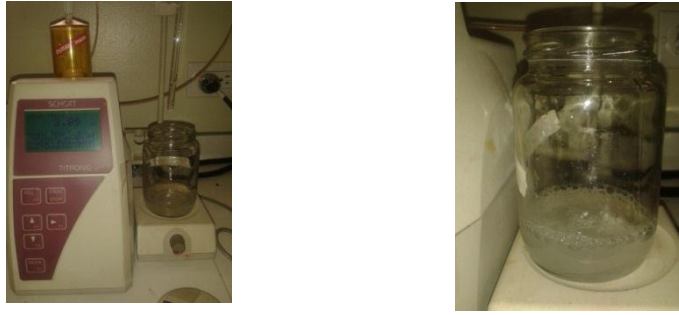


ANTES DE LA TITULACIÓN



Figura 16. Vertido del contenido de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  con fenolftaleína.

## DESPUES DE LA TITULACIÓN



**Figura 17.** Determinación del nivel de respiración.

## Anexo 6

### DISEÑOS EXPERIMENTALES

#### Diseño experimental método Basal

- **El diseño experimental** consta de dos tratamientos: 1) Catamayo y Arenillas; además se utilizó un blanco (muestra sin suelo). Se realizó dos repeticiones por cada muestra, y se tomaron los datos al día uno y siete. (Figura 18).











RESPIRACIÓN BASAL FASE 1						
	CATAMAYO		ARENILLAS		BLANCO	
REPET	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Día 1						
Día 7						
RESPIRACION BASAL FASE 2						
	CATAMAYO		ARENILLAS		BLANCO	
REPET	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Día 1						
Día 7						

Figura 18 diseño experimental de respiración basal

#### Diseño experimental método SIR

- **El diseño experimental** consta de dos tratamientos siendo: 1) Catamayo y Arenillas 2) ECSF; además se utilizó un blanco (muestra sin suelo), y se realizó a las 5 horas de incubación (figura 19).









RESPIRACION INDUCIDA POR EL SUSTRATO (SIR)								
	CATAMAYO		ARENILLAS		ECSF		BLANCO	
REPET	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
5 HORAS								

Figura 19 diseño experimental de respiración inducida por el sustrato