



Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Actividades enzimáticas determinadas en suelos bajo manejo agrícola sostenible

Ismael García Sánchez

2017

Grado en Ciencias Ambientales

Curso 2016/2017

Tutoras:

Fuensanta García Orenes y Alicia Morugán Coronado
Área de Edafología y Química Agrícola

Resumen

Las enzimas son esenciales para el metabolismo microbiano y para el funcionamiento del suelo. La fosfatasa y la β -glucosidasa juegan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica del suelo y en los ciclos biogeoquímicos del fósforo y del carbono. Los efectos del cambio climático afectan a las enzimas y microorganismos del suelo así como a la agricultura. Los manejos agrícolas sostenibles podrían ser capaces de minimizar la alteración actual de los sistemas agrarios e incrementar la resiliencia frente al cambio climático. Uno de los factores externos que más se ha incrementado es la temperatura. La temperatura tiene un impacto fundamental en la actividad de los microorganismos, el metabolismo y las actividades enzimáticas. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la temperatura en la actividad de las enzimas fosfatasa y la β -glucosidasa de tres parcelas de agricultura sostenible del sureste español.

Palabras clave: manejo agrícola sostenible, actividad enzimática, temperatura, fosfatasa, β -glucosidasa.

Abstract

Enzymes are essential for microbial metabolism and for soil functioning. Phosphatase and β -glucosidase play an important role in the mineralization of soil organic matter and in the biogeochemical cycles of phosphorus and carbon. The effects of climate change affect soil enzymes and microorganisms as well as agriculture. Sustainable agricultural management could be able to minimize the current disruption of agricultural systems and increase resilience to climate change. One of the external factors that have increased the most is the temperature. Temperature has a fundamental impact on the activity of microorganisms, metabolism and enzymatic activities. This work has studied the effect of temperature on the activity of the phosphatase and β -glucosidase enzymes from three plots of sustainable agriculture in the southeast of Spain.

Keywords: sustainable agricultural management, enzymatic activity, temperature, phosphatase, β -glucosidase.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Carlos y Alicia por ser más que simplemente unos tutores excelentes. Gracias por enseñarme a amar la ciencia y por despertar en mí el espíritu de la investigación. Gracias por enseñarme las técnicas y el conocimiento necesarios para desenvolverme con soltura en un laboratorio. Gracias por todas esas horas no remuneradas que habéis pasado conmigo para el desarrollo de este estudio. Gracias por siempre demostrarme vuestro afecto y por apoyarme en los momentos de desánimo. Gracias por confiar en mí y por ayudarme a desarrollar mi potencial. Gracias por permanecer a mi lado y ayudarme a terminar el trabajo a pesar de las grandes pruebas y desafíos de la vida. Gracias por ser un ejemplo como profesionales, pero sobre todo por ser personas ejemplares. No tengo palabras para describir el gran respeto y admiración que siento por vosotros, tan sólo puedo daros las gracias y deciros: ¡sois los mejores!

Me gustaría reconocer también la colaboración inestimable de mi tutora y responsable de este trabajo, Fuensanta García Orenes. Así como a todas las personas del Departamento de Agroquímica y Medioambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche por su ayuda y paciencia para conmigo.



HOJA DE ABREVIATURAS

μmol: micromoles.

C: Carbono.

E_a: Energía de activación.

ETRS89: Sistema de Referencia Terrestre Europeo 1989.

g: gramos.

h: hora.

IUSS: Unión internacional de las ciencias del suelo (International Union of Soil Sciences).

K_m: Constante de Michaelis.

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar.

mL: mililitros.

MUB: Tampón universal modificado (Modified Universal Buffer).

N: Nitrógeno.

P: Fósforo.

PNF: p-nitrofenol.

T: Temperatura.

THAM: trishidroximetilaminometano.

USDA: Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture).

UTM: Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator.

V: Actividad o velocidad enzimática.

V_{max}: Actividad o velocidad enzimática máxima.

WRB: Base Referencial Mundial del recurso suelo (World Reference Base).

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

- Figura 1. Tasa de crecimiento de los microorganismos frente a la temperatura, en la cual se indican los puntos mínimo, óptimo y máximo de crecimiento microbiano y los procesos que tienen lugar en cada uno de ellos. Fuente: Prácticas de Microbiología Ambiental, Universidad Miguel Hernández de Elche. 5
- Figura 2. Respuestas térmicas generalizadas de las propiedades catalíticas de las enzimas a un aumento de la temperatura. El esquema explica que la eficiencia catalítica aumenta gradualmente con la temperatura, excepto a 25 ° C, donde se produce un fuerte incremento en K_m . Tomada de: Razavi y col. (2016). 7
- Figura 3. Localización geográfica de las parcelas de estudiadas. Los puntos rojos indican la ubicación de los cultivos, los nombres el término municipal en el que se encuentran los terrenos y las líneas grises los límites de provincia. 11
- Figura 4. Diagramas bioclimáticos de Villena y Jumilla. Fuente: Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial, 1996-2009, S.Rivas-Martínez & S.Rivas-Sáenz, Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España. 12
- Figura 5. Mapa geológico de la Cordillera Bética. Fuente: Estévez, A. y col., 2004. Geología de la provincia de Alicante. Enseñanza de las Ciencias de la Tierra. Vol. 12, N. 1. ISSN 1132-9157..... 13
- Figura 6. Fotografía de la parcela de cultivo de oliva en Biar. Autora: Alicia Morugán. 15
- Figura 7. Fotografías de la parcela de cultivo de manzana en Cañada. Autora: Alicia Morugán. 15
- Figura 8. Fotografías de la parcela de cultivo de paraguay en Jumilla. Autora: Alicia Morugán. 16
- Figura 9. Fotografía del Preparado 500 que se realiza en la finca agrícola de Jumilla. Autora: Alicia Morugán. 16
- Figura 10. Fotografía del Preparado María Thun que se elabora en la finca agrícola de Jumilla. Autora: Alicia Morugán. 17
- Figura 11. A la izquierda: preparación de la recta de calibrado con patrones de p-nitrofenol. A la derecha: Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible empleado para mide la intensidad del color de los filtrados, modelo UNICAM UV500. Autor: Ismael García..... 22
- Figura 12. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de p-nitrofenol en las muestras y los controles de los análisis realizados con la fosfatasa ácida en las parcelas de estudio..... 26
- Figura 13. Curvas de la actividad enzimática fosfatasa para cada parcela de estudio en función de la temperatura de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar. Las distintas letras, indican diferencias significativas tras un test ANOVA ($P < 0,05$). 28
- Figura 14. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de p-nitrofenol en las muestras y los controles de los análisis realizados con la β -glucosidasa en las parcelas de estudio..... 29
- Figura 15. Curvas de actividad enzimática β -glucosidasa para cada parcela de estudio en función de la temperatura de incubación. Las letras, indican diferencias significativas tras el test ANOVA y las barras la desviación estándar..... 30

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima. Fuente: Prácticas de Microbiología Ambiental, Universidad Miguel Hernández de Elche.....	6
Tabla 2. Caracterización de las zonas de estudio en la que se indica la localización, el año de inicio del manejo, el tipo de cultivo y el tipo de manejo agrícola sostenible.	14
Tabla 3. Caracterización de las zonas de estudio donde se muestran los valores medios de conductividad eléctrica, nitrógeno, fósforo, carbonatos, pH, porcentaje de materia orgánica, clasificación textural y morfológica para cada una de las parcelas.....	18
Tabla 4. Temperaturas seleccionadas para medir la actividad de las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa en este estudio y los métodos empleados para obtener una temperatura constante durante la incubación.....	20



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Problemática en los suelos mediterráneos	1
1.2.	Indicadores de calidad del suelo. La diversidad microbiana	2
1.3.	Efecto de la temperatura en la actividad microbiana y enzimática	5
1.4.	Actividad enzimática y agricultura ecológica en España	8
2.	OBJETIVOS	10
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1.	Descripción de las zonas de estudio.	11
3.1.1.	Localización geográfica y cartográfica	11
3.1.2.	Climatología	12
3.1.3.	Geología y geomorfología	13
3.1.4.	Edafología	13
3.2.	Caracterización de las zonas de estudio.	14
3.2.1.	Toma de muestras	19
3.3.	Diseño experimental	19
3.3.1.	Métodos analíticos	21
3.3.1.1.	Actividad fosfatasa ácida	21
3.3.3.2.	Actividad β -glucosidasa	23
3.4.	Análisis estadístico.	25
4.	RESULTADOS	26
4.1.	Enzima fosfatasa ácida	26
4.2.	Enzima β -glucosidasa	29
5.	DISCUSIÓN	31
6.	CONCLUSIONES	33
7.	BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática en los suelos mediterráneos.

Los suelos han de considerarse como un recurso no renovable debido a que los procesos naturales necesarios para su formación ocurren muy lentamente. Los suelos deteriorados por un uso excesivo, problemas de contaminación, salinización, compactación, erosión hídrica y eólica o por otros medios pueden tardar miles de años en recuperarse totalmente.

Al igual que el aire y el agua, el suelo es un componente del entorno, y constituye uno de los recursos naturales más importantes. El uso adecuado de este recurso es esencial para el desarrollo sostenible y la alimentación de la población mundial (Arshad y Martin, 2002). El suelo proporciona el medio físico para el desarrollo de los seres vivos, nutrientes para el crecimiento de las plantas que son esenciales para la nutrición animal y humana, constituye un medio para el reciclado y detoxificación de sustancias orgánicas, así como el reciclado de gases y nutrientes, y actúa como fuente de materias primas (Bezdicsek y col., 1996; Harris y col., 1996).

Para comprender adecuadamente la problemática de los suelos mediterráneos es necesario recordar que los suelos están constituidos por una fase sólida, una líquida y una gaseosa. Dentro de la fase sólida existen materiales inorgánicos y orgánicos. La fracción orgánica fue definida por Buyanovsky y col. (1994) como un “componente muy heterogéneo que incluye numerosos compuestos carbonados, que van desde azúcares fácilmente mineralizables a compuestos complejos y recalcitrantes, que son productos resultantes de transformaciones microbianas, y cuyos tiempos de residencia varían de pocos minutos a cientos de años.” La calidad del suelo se rige en gran medida por su contenido de materia orgánica, siendo éste un atributo dinámico que responde con rapidez a los cambios en la gestión del suelo.

En todo el sureste español, el contenido de materia orgánica de los suelos cultivados disminuye, principalmente a causa de la agricultura intensiva. Los niveles de materia orgánica están llegando, en muchos casos, a situarse por debajo de los mínimos necesarios para mantener un suelo sano, fértil y estable (Zornoza, 2007). El descenso del contenido de materia orgánica puede afectar a la estructura y estabilidad del suelo, a la retención de agua, a la capacidad de amortiguación, a la actividad biológica y al intercambio de nutrientes.

En particular, la región levantina se caracteriza por tener suelos poco evolucionados, de bajo contenido en materia orgánica y alto en carbonato cálcico (Mrabet y col., 2001; Pala y col., 2000). En esta región, el régimen de humedad árido, pudiendo llegar a xérico en algunos casos, y las altas temperaturas promueven una rápida oxidación de la materia orgánica y dificultan el desarrollo de la cubierta vegetal provocando que el aporte de materia orgánica al suelo sea bastante escaso (Cannell y Hawes, 1994).

No obstante, las principales alteraciones que se observan en el equilibrio natural de un suelo vienen producidas por las prácticas agrícolas (Kieft y col., 1994), como por ejemplo, un arado continuado conduce a una fuerte reducción en los niveles de carbono orgánico edáfico. Dicha pérdida se ve potenciada en el mediterráneo debido a que los suelos desarrollados bajo condiciones semiáridas, son más vulnerables a los procesos de degradación, siendo propensos a la pérdida de materia orgánica (Anderson, 2003).

Cada vez hay mayor reconocimiento e interés a nivel internacional en desarrollar metodologías para caracterizar y definir prácticas de gestión que controlen la degradación, mantenimiento y rehabilitación de la calidad del suelo. Es necesaria una metodología para la evaluación de la calidad del suelo con la finalidad de identificar problemas en la producción, hacer estimaciones realistas de la producción, monitorizar cambios en la sostenibilidad de los ecosistemas y ayudar a las administraciones públicas a evaluar y a formular políticas de uso del suelo sostenible (Granatstein y Bezdicek, 1992).

1.2. Indicadores de calidad del suelo. La diversidad microbiana.

Los indicadores de calidad del suelo son parámetros medibles que informan sobre la capacidad del suelo para llevar a cabo sus funciones ambientales y la producción agronómica. Aquellos atributos más sensibles a las prácticas de gestión son los más deseables como indicadores (Arshad y Martin, 2002).

Los microorganismos son muy importantes en el desarrollo y conservación del suelo. Las interrelaciones con el medio abiótico y las sucesiones durante la descomposición de la materia orgánica de estos microorganismos son parte del proceso autorregulador que determina el funcionamiento del suelo. Por otro lado, en la búsqueda de indicadores de calidad adecuados es necesario incluir parámetros que representen los enlaces entre el medio biótico y abiótico (Anderson, 2003). En este sentido, indicadores relativos a la biodiversidad y la estructura de las comunidades microbianas son indicadores potenciales del funcionamiento y sostenibilidad del ecosistema, ya que son sensibles y responden de forma rápida y directa a los cambios en el

medio. Por tanto, uno de los indicadores más utilizados son los que hacen referencia a la actividad enzimática.

La actividad enzimática es un factor clave del suministro de nutrientes a las plantas y de la descomposición de la materia orgánica, ya que integra información sobre el estado microbiano y las condiciones fisicoquímicas del suelo (Aon y Colaneri, 2001; Baum y col., 2003; Sinsabaugh y col., 2008). Las enzimas del suelo son producidas principalmente por microorganismos y, en menor medida, por plantas y animales. Algunas de ellas están asociadas directamente a los microorganismos, mientras otras son sintetizadas y secretadas al exterior. Dentro de las enzimas extracelulares se encuentran la fosfatasa y la β -glucosidasa que, siendo secretadas por muchas bacterias y hongos, constituyen una parte importante de la matriz del suelo (Sinsabaugh y Moorhead, 1994).

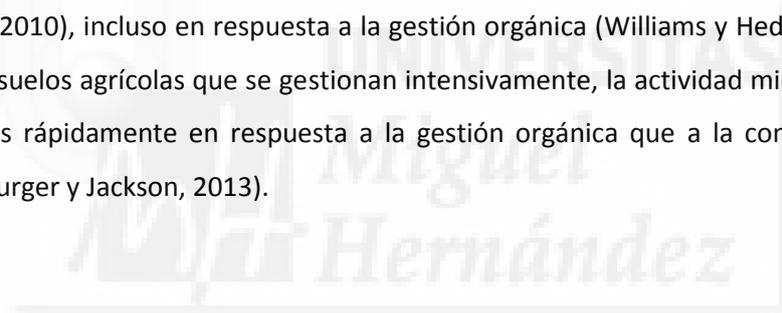
Existe un gran interés en el uso de la actividad enzimática extracelular como indicador biológico de la calidad del suelo porque es relativamente sencilla de medir, es sensible al estrés ambiental y responde rápidamente a los cambios en el manejo del suelo (Yakovchenko y col., 1996; Dick, 1997). La actividad de las enzimas extracelulares también puede verse directamente afectada por factores como la temperatura, humedad, pH, disponibilidad de nutrientes y propiedades químicas de la capa superficial (Sinsabaugh y col., 2008; Baldrian y col., 2012).

La fosfatasa y la β -glucosidasa juegan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica del suelo. Por un lado, las fosfatasas (EC 3.1.3) se encuentran entre las enzimas que transforman el fósforo orgánico y no asimilable en iones fosfato que pueden ser absorbidos por microorganismos y plantas (Eivazi y Tabatabai, 1977). Las enzimas fosfatasa pueden ser buenas indicadoras de la mineralización potencial del fósforo orgánico y de la actividad biológica de los suelos (Dick y Tabatabai, 1993). La actividad de las fosfatasas se relaciona con el suelo y con las condiciones de la vegetación (Herbien y Niel, 1990), responde a cambios en el manejo del suelo y puede estar relacionada con los cambios estacionales en la temperatura y humedad del suelo (Speir y Cowling, 1991). La actividad se ve afectada por las condiciones ambientales, pero también refleja y retroalimenta la estructura de la comunidad microbiológica (Sinsabaugh y col., 2002; Lellei-Kovács y col., 2011).

Por otro lado, la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) es responsable de la descomposición de carbohidratos de bajo peso molecular, produciendo azúcares como producto de su hidrólisis, las cuales son una importante fuente de recursos para los microorganismos del suelo (Eivazi y

Tabatabai, 1990). Esta enzima es muy activa en las primeras fases de la degradación de los compuestos orgánicos, en las cuales se reduce el tamaño molecular de las estructuras orgánicas facilitando así la futura actividad microbio-enzimática (Sardans y col., 2008). La β -glucosidasa es producida por muchos y diversos hongos, incluyendo los basidiomicetos descomponedores de la madera (Conn y Dighton, 2000). Estudios de la actividad de la enzima β -glucosidasa muestran que se concentran en la capa superior del suelo y que su concentración disminuye con la profundidad. Dicha actividad se correlaciona significativamente con el carbono orgánico en los perfiles y capa superficial del suelo y, en muchos casos, se correlaciona negativamente con el pH (Eivazi y Tabatabai, 1990).

La actividad enzimática es generalmente mayor en la rizosfera que en los agregados del suelo como resultado de un incremento de la actividad microbiana, propiciada por los exudados o las enzimas liberadas por las raíces (George y col., 2005; Villányi y col., 2006). Los cambios en la composición de la comunidad microbiana pueden ser relativamente limitados en los paisajes agrícolas con un legado de manejo agrícola intensivo (Fraterrigo y col. 2016; Culman y col. 2010), incluso en respuesta a la gestión orgánica (Williams y Hedlund, 2013). De hecho, en los suelos agrícolas que se gestionan intensivamente, la actividad microbiana tiende a cambiar más rápidamente en respuesta a la gestión orgánica que a la composición de la comunidad (Burger y Jackson, 2013).



1.3. Efecto de la temperatura en la actividad microbiana y enzimática.

El desarrollo de los microorganismos se encuentra influenciado por varios factores. La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes ya que condiciona su crecimiento y supervivencia. Cada microorganismo, suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantengan constantes, muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura (Figura 1).

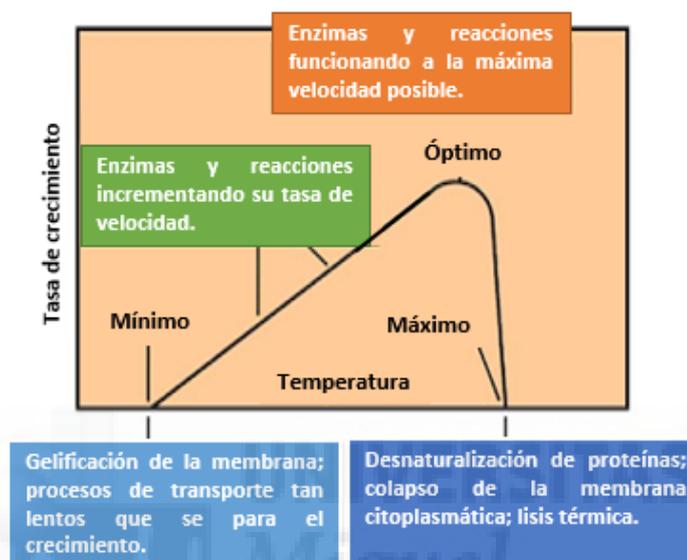


Figura 1. Tasa de crecimiento de los microorganismos frente a la temperatura, en la cual se indican los puntos mínimo, óptimo y máximo de crecimiento microbiano y los procesos que tienen lugar en cada uno de ellos. Fuente: Prácticas de Microbiología Ambiental, Universidad Miguel Hernández de Elche.

En la Figura 1 se pueden distinguir tres puntos característicos llamados temperaturas cardinales: la temperatura mínima, por debajo de la que se inhibe el crecimiento o entran en una fase de letargo, aunque generalmente no mueren; la temperatura máxima, a partir de la cual los microorganismos no pueden vivir e incluso mueren; y la temperatura óptima a la cual ofrecen el mejor crecimiento. El margen entre la temperatura mínima y la máxima se suele llamar margen de crecimiento, y en muchos microorganismos suele comprender unos 40 °C.

La temperatura mínima se puede explicar en función de un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones. Por encima de la temperatura mínima la tasa de crecimiento va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la temperatura óptima, debido a que las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas se van aproximando a su óptimo. En condiciones de temperatura óptima las enzimas y reacciones se dan a su máxima tasa posible.

A partir de ese punto, si la temperatura continúa incrementándose se produce un descenso acusado de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la temperatura máxima. Dicha temperatura refleja desnaturalización o inactivación de proteínas y enzimas esenciales, colapso de la membrana citoplasmática y, en ocasiones, lisis térmica del microorganismo.

Cada especie o cepa microbiana tiene temperaturas cardinales distintas, de modo que un microorganismo puede presentar una temperatura óptima superior a la temperatura máxima de otro, o inferior a la temperatura mínima de un tercero. Según el rango de temperaturas al que pueden crecer los distintos microorganismos, se pueden clasificar en mesófilos, psicrófilos, psicrótrofos y termófilos, según lo indicado en la Tabla 1. Además de los mencionados anteriormente, existen organismos hipertermófilos que pueden crecer a temperaturas cercanas o incluso superiores a 100 °C en condiciones de alta presión.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima. Fuente: Prácticas de Microbiología Ambiental, Universidad Miguel Hernández de Elche.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura óptima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Características
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 - 47	Incluye microorganismos patógenos y comensales del hombre y animales de sangre caliente y algunos de vida libre.
Psicrófilo	-5 +5	12-15	15 - 20	Incluye microorganismos de vida libre.
Psicrótrofo	-5 + 5	25 - 30	30 - 35	Incluye microorganismos de vida libre.
Termófilo	40 - 45	55 - 75	60 - 90	Suelen ser microorganismos de vida libre

Los microorganismos en el medio natural se sobreponen a las condiciones cambiantes que exigen una amplia gama de adaptaciones metabólicas (Neidhardt y col., 1990). El incremento de la temperatura del suelo, los niveles elevados de dióxido de carbono atmosférico (Finzi y col., 2006) y el aumento de la frecuencia de los ciclos de humectación y secado (Fierer y col., 2003), pueden cambiar la composición de las comunidades microbianas y aumentar las actividades de la biomasa y las enzimas (Henry y col., 2005; Allison y Treseder, 2008). De hecho, ya se ha estudiado que algunos microorganismos pueden disminuir la síntesis enzimática y la secreción de enzimas extracelulares en respuesta al incremento de la temperatura (Allison, 2005; Wallenstein y col., 2012).

El incremento de temperatura tiene un impacto fundamental en la actividad de los microorganismos, el metabolismo y las actividades enzimáticas (Allison y col., 2010; Van Gestel y col., 2013; Zimmermann y Bird, 2012). Las enzimas son esenciales para el metabolismo microbiano y para el funcionamiento del suelo, ya que despolimerizan grandes compuestos orgánicos generando oligómeros y monómeros solubles que pueden ser transportados a las células (Blagodatskaya y col., 2016; Wallenstein y col., 2010).

Blagodatskaya y col. (2016) propusieron tres mecanismos para explicar la adaptación térmica de los procesos catalizados por enzimas: 1) cambio en la afinidad del sustrato de los sistemas enzimáticos (es decir, en K_m que se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la velocidad máxima), lo que puede reflejar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana, 2) reducción de la biomasa microbiana del suelo y expresión enzimática a temperaturas elevadas, que pueden estar relacionadas con alteraciones en la fisiología microbiana, y 3) cambios en la cantidad y calidad del sustrato, que afectan las tasas de reacción de procesos catalizados por enzimas.

La actividad enzimática es una función saturante de la concentración de sustrato (Michaelis y Menten, 1913). La saturación enzimática se produce cuando todos los centros activos enzimáticos están ocupados por sustrato. En este caso, añadir más sustrato no aumenta la velocidad global de la reacción. La velocidad de reacción catalítica máxima a una temperatura dada (V_{max}) y la constante de saturación media (K_m) son sensibles a la temperatura (Davidson y col., 2006; Davidson y Janssens, 2006) y generalmente aumentan con la temperatura (Stone y col., 2012), tal como se muestra en la Figura 2.

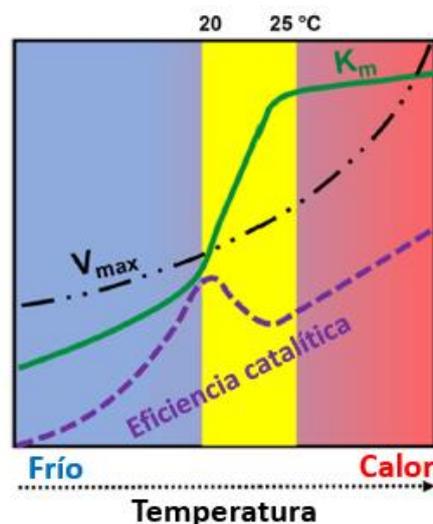


Figura 2. Respuestas térmicas generalizadas de las propiedades catalíticas de las enzimas a un aumento de la temperatura. El esquema explica que la eficiencia catalítica aumenta gradualmente con la temperatura, excepto a 25 °C, donde se produce un fuerte incremento en K_m . Tomada de: Razavi y col. (2016).

A temperaturas elevadas la inactivación de las enzimas se convierte en el factor limitante y pasa a ser mucho más importante que el aumento de la velocidad de reacción. Basándose en ello, Eivazi y Tabatabai (1990) estudiaron el efecto de la temperatura en la enzima β -glucosidasa observando que normalmente se inactiva a unos 70 °C. Estudios del efecto de la temperatura en la actividad enzimática han mostrado que la temperatura necesaria para inactivar las enzimas en los suelos es alrededor de 10 °C mayor que la necesaria para inactivar las enzimas en la ausencia de suelo (Skujins, 1976).

Con todo ello, Eivazi y Tabatabai diseñaron los distintos métodos de ensayo para medir la actividad enzimática en suelo de las enzimas β -glucosidasa y fosfatasa, entre otras. Ellos se aseguraron de que los reactivos empleados para la extracción del p-nitrofenol no causarían la hidrólisis química de los sustratos, que dicho sustrato estuviera en exceso y que el pH de la reacción fuera próximo al óptimo. En cuanto a la temperatura de reacción, decidieron incubar las muestras de suelo con el sustrato y la solución extractante a 37 °C durante 1 hora porque esa era la temperatura más utilizada para los ensayos de la β -glucosidasa y de otras actividades enzimáticas y porque, en trabajos anteriores con suelos, ellos habían comprobado que no era necesario usar una temperatura mayor para obtener resultados precisos.

Sin embargo, esa temperatura no es significativa de los suelos ya que, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la temperatura media anual del suelo con frecuencia es estimada a través de la adición de 1 °C a la temperatura atmosférica media anual. Esto sugiere que quizás sería más correcto medir la actividad enzimática a 25 °C, que es la temperatura ambiente estipulada mundialmente.

1.4. Actividad enzimática y agricultura ecológica en España.

El clima está cambiando debido al aumento continuado de las concentraciones de CO₂ y otros gases de efecto invernadero en la atmósfera, lo que resulta en un calentamiento global y en la alteración de los patrones de precipitaciones (Burns y col., 2013). Debido a que las actividades de las enzimas en entornos naturales están controladas tanto por factores abióticos (por ejemplo, temperatura, potencial hídrico y pH) como por procesos bióticos (por ejemplo, síntesis y secreción enzimática), es probable que sean sensibles al calentamiento atmosférico y a las variaciones cada vez más frecuentes y extremas de los patrones de precipitaciones. Estos cambios podrían tener importantes consecuencias para los servicios ecosistémicos mediados por enzimas como la descomposición, el ciclo de los nutrientes y las

interacciones plantas-microbios, que en última instancia afectarán a la productividad y al equilibrio neto de carbono (Burns y col., 2013).

Ante el escenario de alteración de los sistemas agrarios y de disminución de la productividad de los cultivos alimenticios, es urgente la búsqueda de alternativas para desarrollar agrosistemas resilientes frente al cambio climático, que contribuyan al desarrollo en el medio rural y que, al mismo tiempo, produzcan alimentos sanos suficientes para alimentar a la población mundial, todo ello dentro de un marco de sostenibilidad. La adaptación de sistemas agrarios al cambio climático puede ser el desafío más importante al que se enfrente la humanidad en las próximas décadas (Esquinas, 2013; Williams, 2013).

La agricultura ecológica podría ser capaz de minimizar la alteración actual de los sistemas agrarios, e incrementar la resiliencia frente al cambio climático, pues se compone de un compendio de técnicas agrarias que excluyen normalmente el uso, en la agricultura y ganadería, de productos químicos de síntesis como fertilizantes, plaguicidas, antibióticos, etc., con el objetivo de preservar el medio ambiente, mantener o aumentar la fertilidad del suelo y proporcionar alimentos con todas sus propiedades naturales (MAGRAMA, 2009).

Uno de los fundamentos ideológicos de cualquiera de las variantes de la agricultura ecológica es la consideración del suelo como un sistema complejo, en equilibrio dinámico, en el que los seres vivos que habitan en él tienen un papel esencial en el sostenimiento de su fertilidad. Las medidas de la actividad biológica y el conocimiento en profundidad de los ciclos de los nutrientes son claves en cualquier investigación acerca de los distintos aspectos que conforman el manejo ecológico de un suelo agrícola.

En la literatura científica abundan los estudios acerca de los efectos de la agricultura ecológica sobre la biomasa microbiana y la respiración mientras que son muy escasos los referentes al estudio de las actividades enzimáticas más específicas.

Teniendo en cuenta la relativa escasez de este tipo de trabajos en la literatura científica, particularmente en España, queda claro el enorme interés y potencialidad del estudio de los diferentes índices de la actividad biológica del suelo, especialmente los basados en las actividades enzimáticas por su relación con los ciclos de los nutrientes, en el contexto de la agricultura ecológica.

2. OBJETIVOS

Mediante el presente estudio se pretende estudiar el efecto de la temperatura en las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa de tres suelos mediterráneos bajo manejo agrícola sostenible, los cuales difieren en el tipo de cultivo que se desarrolla en ellos pero cuya localización y condiciones climáticas son muy similares. Por consiguiente, este estudio tiene como objetivo principal:

1. Observar el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de suelos agrícolas ecológicos del sureste español.

Además, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

2. Determinar la temperatura óptima de actividad para las enzimas estudiadas.
3. Proponer una medida más realista de la actividad de estas enzimas en los suelos mediterráneos.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Descripción de las zonas de estudio.

Se seleccionaron tres parcelas bajo condiciones climáticas similares con cultivos característicos de nuestra región (olivos, manzanos y paraguayos) con el fin de conocer el comportamiento de las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa en suelos agrícolas bajo manejo sostenible, ya que existen numerosos estudios desarrollados sobre las enzimas en suelos climáticos o forestales, pero son escasas las experiencias que estudien la respuesta de estos indicadores en suelos agrícolas sostenibles.

3.1.1. Localización geográfica y cartográfica.

Las parcelas estudiadas se localizan en los municipios de Cañada, Biar y Jumilla. En la Figura 3 se muestra la localización de las tres parcelas de estudio tomando como referencia el sistema geodésico ETRS89 (European Terrestrial Reference System 1989), Huso 30 y Banda S. Las coordenadas UTM correspondientes a cada zona de estudio son: Cañada X: 691915m Y: 4281914m; Biar X: 693143m Y: 4277712m; Jumilla X: 640798m Y: 4251271m.

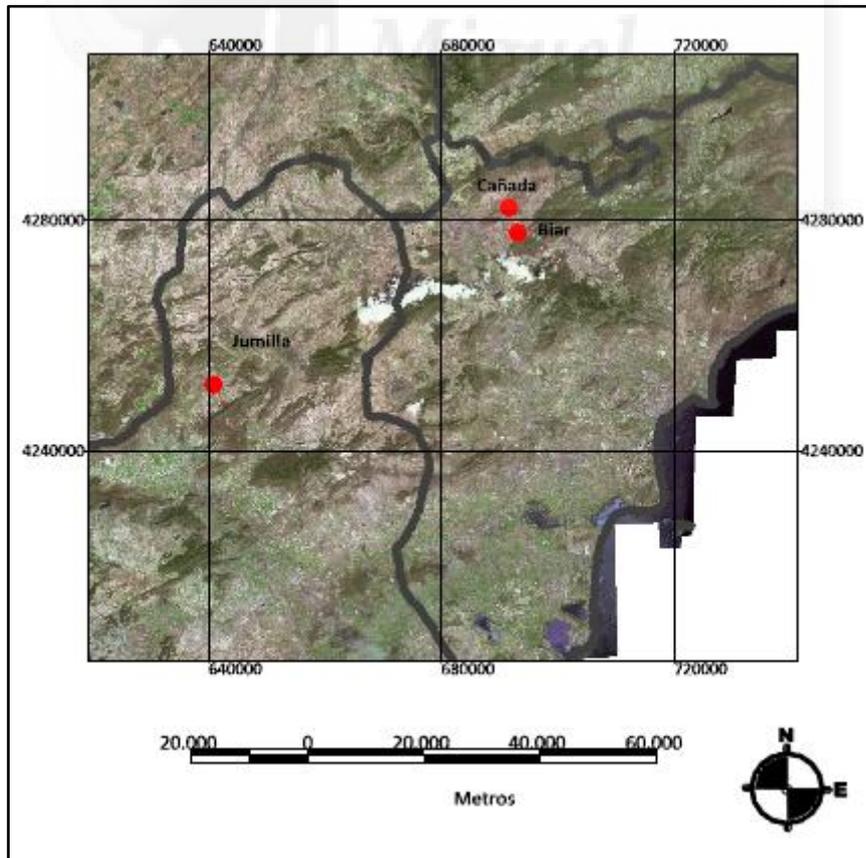


Figura 3. Localización geográfica de las parcelas de estudiadas. Los puntos rojos indican la ubicación de los cultivos, los nombres el término municipal en el que se encuentran los terrenos y las líneas grises los límites de provincia.

Los municipios de Biar y de Cañada están situados en el interior de la provincia de Alicante a una altitud de 700 metros sobre el nivel del mar y se encuentran ubicados a 7 km de Villena, en la Comunidad Valenciana. La agricultura y la industria son las bases de su economía. Destaca el cultivo del olivo y el regadío con diversos árboles frutales. Por otra parte, Jumilla está situado al Noreste de la Comunidad Autónoma de Murcia formando gran parte de la Comarca del Altiplano, donde predomina el cultivo de la vid y de árboles frutales.

3.1.2. Climatología.

Las zonas de estudio se localizan en la Región Biogeográfica Mediterránea, termotipo mesomediterráneo y ombrotipo semiárido en Jumilla y seco en Cañada y Biar (Rivas-Martínez, 1981). Los diagramas bioclimáticos más cercanos a las parcelas de estudio son los pertenecientes a Villena y Jumilla, los cuales están representados en la Figura 4. En ellos se puede observar que el periodo de aridez se extiende desde finales del mes de mayo hasta mediados de septiembre en Villena y mediados de octubre en Jumilla. Los meses de primavera y otoño son los más lluviosos, siendo octubre el mes con mayor índice de precipitaciones en Villena y mayo en Jumilla. Los meses más cálidos son julio y agosto, mientras que los más fríos son diciembre y enero. La temperatura media anual en Jumilla es de 14,9°C y en Villena de 13,7°C, siendo la precipitación media anual de 313 y 359 mm respectivamente.

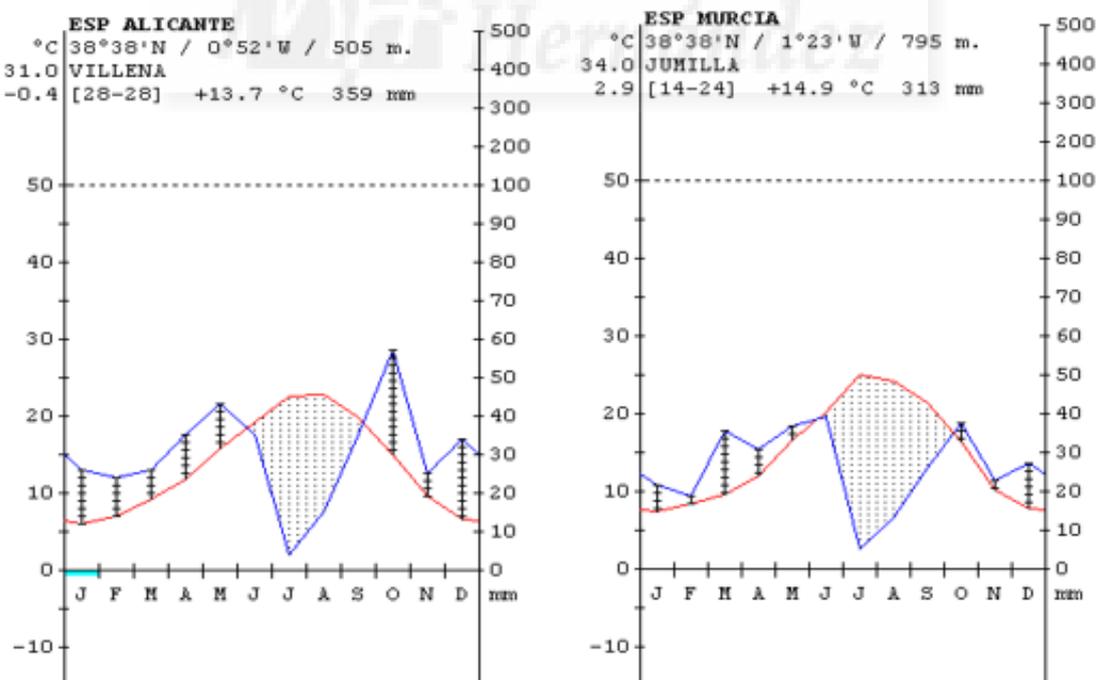


Figura 4. Diagramas bioclimáticos de Villena y Jumilla. Fuente: Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial, 1996-2009, S.Rivas-Martínez & S.Rivas-Sáenz, Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España.

3.1.3. Geología y geomorfología.

Las parcelas de estudio se enmarcan en las Zonas Externas de las Cordilleras Béticas, representadas en la Figura 5 con rayas verticales y color gris claro. El relieve se configura en una serie de alineaciones montañosas alargadas de dirección Suroeste-Noreste resultado de la orogenia alpina. Sólo quedan distorsionadas por la presencia de diapiros, y separados por amplios valles corredores ocupados por glaciares de acumulación, cuyos fondos están surcados frecuentemente por ramblas de desarrollo variable.

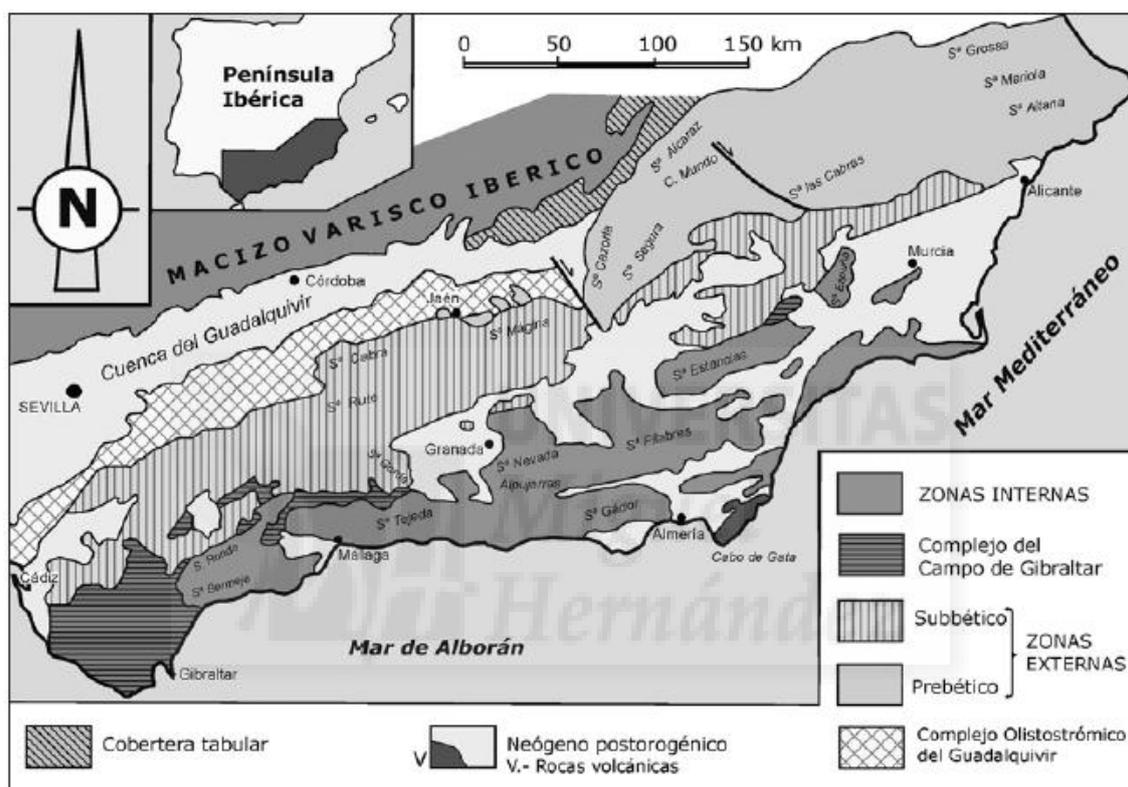


Figura 5. Mapa geológico de la Cordillera Bética. Fuente: Estévez, A. y col., 2004. Geología de la provincia de Alicante. Enseñanza de las Ciencias de la Tierra. Vol. 12, N. 1. ISSN 1132-9157.

3.1.4. Edafología.

Los suelos agrícolas de las diferentes parcelas se clasificaron según la Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (IUSS, 2007) en función de sus horizontes, propiedades y materiales de diagnóstico.

En la parcela agrícola de Cañada se encontraron suelos desarrollados en depósitos aluviales de los valles del río Vinalopó, clasificados como Fluvisoles. Se trata de suelos jóvenes y fértiles cuyo perfil se caracteriza por la evidencia de estratificación y la débil diferenciación de horizontes, aunque puede presentar un horizonte superficial bien definido. Los Fluvisoles pueden albergar cultivos de secano, normalmente con algún tipo de control de agua, ya que

un período seco puede estimular la actividad microbiana y promover la mineralización de materia orgánica.

Los Regosoles son frecuentes en zonas áridas y semiáridas, como es el caso de Biar. Se trata de suelos minerales débilmente desarrollados sobre materiales no consolidados de grano fino y que no tienen horizonte mólico o úmbrico. En este tipo de suelos se aconseja el cultivo de secano, debido a que la baja capacidad de retención de humedad obliga a aplicaciones frecuentes de agua de riego.

En los suelos de las parcelas de estudio de Jumilla se puede apreciar diferenciación entre los horizontes del suelo, evidentes por los cambios en la estructura, color, contenido de arcilla o contenido de carbonatos, por lo que fueron clasificados como Cambisoles. Éstos se caracterizan por presentar meteorización ligera o moderada del material parental, de textura media a fina, y por la ausencia de cantidades apreciables de arcilla y materia orgánica. Sin embargo, los contenidos de materia orgánica y arcilla observados fueron demasiado elevados para este tipo de suelos, debido probablemente al tipo de manejo agrícola sostenible.

3.2. Caracterización de las zonas de estudio.

Para este estudio fueron seleccionadas tres parcelas agrícolas sometidas a manejos agrícolas sostenibles. En la Tabla 2 se indica la localización de las mismas, la variedad de cultivo, el año de inicio del manejo sostenible y el tipo de manejo que se emplea.

Tabla 2. Caracterización de las zonas de estudio en la que se indica la localización, el año de inicio del manejo, el tipo de cultivo y el tipo de manejo agrícola sostenible.

Parcelas	Localización	Año de inicio del manejo	Cultivo	AMP
1	Biar	2015	Oliva (<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i>)	Reducción de labranza y aplicación de compost
2	Cañada	1998	Manzana (<i>Malus domestica</i>)	Reducción de labranza, aplicación de estiércol y paja
3	Jumilla	1998	Paraguay blanco variedad Flat Queen (<i>Prunus persica</i> var. <i>platycarpa</i>)	Agricultura biodinámica

Por un lado, en la parcela 1 (Figura 6) se añade compost en el punto de riego y se reduce la labranza, se trata del manejo menos sostenible de los tres estudiados.



Figura 6. Fotografía de la parcela de cultivo de oliva en Biar. Autora: Alicia Morugán.

Por otro lado, en la parcela 2 (Figura 7) se minimiza la labranza y se cubre el suelo con paja y estiércol a fin de reducir la pérdida de suelo y aumentar la materia orgánica. En ningún momento se aplican pesticidas ni fertilizantes inorgánicos.



Figura 7. Fotografías de la parcela de cultivo de manzana en Cañada. Autora: Alicia Morugán.

Por último, en la parcela 3 (Figura 8) se llevan a cabo tratamientos con preparados biodinámicos. La agricultura biodinámica se diferencia de otros tipos de agricultura ecológica en el uso de preparados vegetales y minerales como aditivos para el compost y aerosoles para el terreno, así como en el seguimiento de un calendario de siembra basado en el movimiento de los astros (<http://www.biodinamica.es>). Como en otras formas de agricultura ecológica, se evita el uso de fertilizantes, pesticidas y herbicidas industriales.



Figura 8. Fotografías de la parcela de cultivo de paraguayo en Jumilla. Autora: Alicia Morugán.

En la finca de Jumilla se elaboran y se aplican la mayoría de preparados de agricultura biodinámica, pero especialmente se utilizan dos de ellos, el preparado de boñiga en cuerno (Preparado 500) y el Preparado de María Thun.

La realización del Preparado 500 comienza a principio de otoño, época cuando los cuernos de vaca (Figura 9) deben llenarse con estiércol sin paja, preferiblemente de vacas preñadas, de manera que no queden espacios de aire en su interior. Tras ello se entierran hasta la primavera en suelo de pradera o de forraje que tenga una buena capa de humus. Hay que evitar los suelos pantanosos, los suelos con raíces de árboles o arbustos y las cercanías de muros de caminos y de zanjas. El contenido se saca del cuerno y se almacena en un lugar seco, en un cajón rodeado de turba rubia. Los cuernos pueden volver a usarse.



Figura 9. Fotografía del Preparado 500 que se realiza en la finca agrícola de Jumilla. Autora: Alicia Morugán.

La dosis óptima de Preparado 500 es de unos $250 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$. La cantidad de Preparado 500 y agua necesarios en cada dinamización debe calcularse en función de la cuba de dinamización,

la cual no puede ser de plástico, y de las hectáreas de terreno a tratar puesto que se suelen aplicar unos 40-50 litros de agua dinamizada·ha⁻¹. Esta dinamización debe hacerse al aire libre y consiste en remover la mezcla de preparado y agua durante una hora exacta, primeramente girando hacia un lado y cuando el torbellino sea profundo, cambiando el sentido del giro. Si la superficie en la que se va a aplicar los preparados es muy grande la dinamización puede ser mecanizada, debido a la gran masa de agua requerida.

Con este preparado se pretende estructurar la tierra para revitalizarla. Se efectúa en otoño o primavera, pero nunca si la tierra está congelada. Es conveniente hacerlo junto al labrado aunque también se puede aplicar con el cultivo implantado. La aplicación se debe realizar por la tarde, cuando el sol descende, y mediante pulverización en gota gruesa bien manualmente, con mochila aplicadora o con un cubo y una escoba de ramitas, o bien mecánicamente mediante tractor con una barra de aplicación adaptada.

Para el Preparado de María Thun (Figura 10) se hace un agujero de unos 60 cm de ancho y 40 cm de profundidad en la tierra del jardín o del huerto, cubriendo las paredes con ramas de abedul y protegiéndolo de la lluvia. El agujero se llena con una mezcla de boñiga de vaca, cáscaras de huevo y polvo de basalto, la cual se remueve con una pala durante una hora antes de llenar el agujero. El preparado se deja reposar allí durante unas ocho semanas. Cuando tiene color marrón oscuro se toman unos 240 g y se dinamiza del mismo modo, pero solo durante 20 minutos. La dinamización y pulverización se realiza con los mismos patrones descritos anteriormente para el Preparado 500.



Figura 10. Fotografía del Preparado María Thun que se elabora en la finca agrícola de Jumilla. Autora: Alicia Morugán.

El tipo de manejo agrícola determina considerablemente las propiedades, estructura y estabilidad del suelo. De modo que para caracterizar los suelos estudiados se midió el

porcentaje de materia orgánica, el pH, la conductividad eléctrica (C.E.) y los valores medios de nitrógeno (N), fósforo (P) y carbonatos. En cuanto a la textura, se determinaron los distintos porcentajes de arcilla, arena y limo, y se clasificaron según las indicaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Los valores obtenidos se representan en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización de las zonas de estudio donde se muestran los valores medios de conductividad eléctrica, nitrógeno, fósforo, carbonatos, pH, porcentaje de materia orgánica, clasificación textural y morfológica para cada una de las parcelas.

Parcela	1	2	3
Localización	Biar	Cañada	Jumilla
Suelo (World Reference Base for Soil Resources)	Regosol	Fluvisol	Cambisol
% Arcilla	9,4	27	12,4
% Arena	84,8	29	51,8
% Limo	5,8	43	35,8
Textura (USDA)	Franco arenoso	Franco arcilloso	Franco
% Materia Orgánica	0,6	1,4	5,7
Nitrógeno asimilable (g/kg)	0,66	1,32	4,90
Fósforo asimilable (mg/kg)	48,82	11,05	265,48
Carbonatos (mg/kg)	5,62	38,50	22,68
pH	8,7	8,2	8,0
Conductividad Eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	135,2	452	1157

Como era de esperar, la parcela 1 presenta los valores más bajos de materia orgánica, nitrógeno y carbonatos, aunque el contenido de fósforo asimilable es bastante elevado debido probablemente a la aplicación de alguna enmienda realizada por el agricultor. Se trata de un suelo con un alto porcentaje en arena y bajo en arcillas, por lo que pueden producirse pérdidas por filtración debido a su escasa capacidad de retención hídrica.

Por otra parte, en la parcela 2 se viene desarrollando un manejo agrícola sostenible orientado a minimizar las pérdidas de suelo y aumentar la materia orgánica desde un periodo considerable de tiempo. El esfuerzo de esos agricultores se refleja en un suelo con propiedades edáficas relativamente estables, rico en nutrientes, con un pH y una conductividad eléctrica que facilitan la disponibilidad de los nutrientes para las plantas. A pesar de todo ello, esta parcela presenta el valor de carbonatos más alto en comparación con el resto de los suelos estudiados.

Por último, los años de aplicación de agricultura biodinámica en la parcela 3 han resultado en un suelo con contenidos en materia orgánica y nutrientes muy elevados. Tras casi 20 años de manejo sostenible, esta parcela ha visto una mejora en cuanto a fertilidad, estructura, compactación y estado nutricional del suelo. No obstante, el valor de conductividad eléctrica es el más alto de los suelos estudiados.

3.2.1. Toma de muestras.

Los muestreos se realizaron los días 11 y 19 de octubre de 2016. El 11 de octubre se tomaron, en las parcelas 1 y 2, tres muestras combinadas de tres submuestras de los 10 primeros cm de suelo, en el momento de la toma de muestras se registró la temperatura de los 10 primeros cm de suelo, cuyas temperaturas, medidas en ese momento, fueron de 21,8 °C y 18,5 °C respectivamente. El 19 de octubre se tomaron tres muestras combinadas de tres submuestras de la parcela 3 registrándose una temperatura de 18,4 °C. Una vez tomadas las muestras, se mantuvieron a una temperatura constante de 4 °C con la finalidad de mantener su contenido de humedad para su posterior análisis en el laboratorio.

3.3. Diseño experimental

Para comenzar, se seleccionaron las temperaturas para los análisis en función de los óptimos de actividad descritos en la introducción y basándose en estudios anteriores sobre el efecto de la temperatura en la actividad enzimática (Eivazi y Tabatabai, 1977; Eivazi y Tabatabai, 1990; Wallenstein y col., 2010; Van Gestel y col., 2013; Razavi y col., 2016). Las temperaturas seleccionadas finalmente para las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa se muestran en la Tabla 4, en la que también se expone el método empleado para controlar la temperatura de incubación. Durante los análisis realizados la temperatura se midió y controló constantemente con un termopar.

A medida que se avanzó en la investigación, se observó que cada enzima presentaba diferentes curvas características de actividad enzimática frente a la temperatura. Por lo que fue necesario seleccionar nuevas temperaturas de análisis, las cuales diferían de una enzima a otra, a fin de poder obtener su curva característica de actividad para cada una de ellas.

Por un lado, la actividad de la β -glucosidasa a 80 °C se aproximaba a la temperatura cardinal máxima por lo que no era indispensable realizar experiencias a temperaturas mayores. Sin embargo, a 25 °C la actividad de la enzima β -glucosidasa estaba mucho del punto mínimo de actividad, por lo que se requería un análisis a 15 °C a fin de obtener resultados próximos a cero. Por otro lado, para la enzima fosfatasa no se realizó la experiencia a 15 °C

debido a que a 25 °C la actividad fue mínima, por lo que se optó por medir la actividad a 90 °C. Se escogió dicha temperatura debido a que la actividad de la fosfatasa a 80 °C era bastante elevada y se pretendía encontrar una temperatura que sobrepasara el punto óptimo pero que no alcanzara el máximo, en el cual se produce la lisis térmica y no hay actividad.

Tabla 4. Temperaturas seleccionadas para medir la actividad de las enzimas fosfatasa y β -glucosidasa en este estudio y los métodos empleados para obtener una temperatura constante durante la incubación.

Fosfatasa Tª (°C)	β -Glucosidasa Tª (°C)	Control de la Temperatura
90	-	Baño termostatzado, tubos autoclavables y tapones tipo Cap-O-Test.
80	80	Baño termostatzado, tubos autoclavables y tapones tipo Cap-O-Test.
60	60	Baño termostatzado, tubos autoclavables y parafilm
45	45	Baño termostatzado, tubos autoclavables y parafilm
37	37	Baño termostatzado, tubos autoclavables y parafilm.
25	25	Baño termostatzado, tubos autoclavables y parafilm.
-	15	Refrigerador.

Para cada una de las temperaturas de estudio seleccionadas se pesó cada muestra de suelo por duplicado a fin de disminuir el error del ensayo en laboratorio. Por tanto, para conocer la actividad enzimática en cada una de las experiencias fueron necesarias un total de 36 muestras con sus respectivos 36 controles

Por último, debido a que se pretende cuantificar la actividad enzimática a temperaturas diferentes a la indicada por el método analítico, fue necesario introducir un patrón interno en cada uno de los análisis para corregir la medida de p-nitrofenol. En los patrones internos, a diferencia de las muestras y controles, no hay suelo y, por tanto, indican cuanto p-nitrofenol se forma por la acción de la temperatura y no por la actividad enzimática, eliminando así posibles interferencias en la medida y permitiendo obtener un valor más adecuado de la actividad enzimática de los suelos de estudio. En consecuencia, el uso del patrón interno permitió conocer la degradación sufrida por el sustrato bajo cada condición experimental utilizada.

Los patrones internos estuvieron sometidos a las mismas condiciones que las muestras. Para su preparación, en primer lugar se añaden 2 mL de tampón MUB (pH 6,5) y 0,5 mL de la solución de sustrato que corresponda, se agita el tubo y se tapa. En segundo lugar, se incuba en un baño de agua, junto con las muestras y controles, a la temperatura de análisis durante 1 hora. Después, se introduce en la nevera durante 15 minutos. En tercer lugar, se añade en 0,5 mL de cloruro de calcio 0,5 M y 2 mL de hidróxido de sodio 0,5 M y se agita para que la suspensión se mezcle completamente. A continuación se añaden 5 mL de agua destilada y se centrifuga (4000 r.p.m. durante 4 minutos). Por último se mide la intensidad del color de los filtrados en un espectrofotómetro a 400 nm.

3.3.1. Métodos analíticos.

El carbono orgánico se midió mediante oxidación con dicromato potásico y posterior valoración con sulfato ferroso amónico (Walkley y Black, 1934), el pH fue medido en extracto acuoso con agua desionizada (1:2,5 p/v), la conductividad eléctrica fue determinada también en extracto acuoso con agua desionizada (1:5 p/v), la textura se determinó con el método Bouyoucos (Gee y Bauder, 1986), los carbonatos del suelo se determinaron mediante un calcímetro tipo Bernard, el fósforo asimilable se determinó con el método de Burriel-Hernando (Díez, 1982), para determinar el nitrógeno se utilizó el método Kjeldahl, la actividad de la fosfatasa ácida se determinó con el método de Tabatabai y Bremmer (1969) y la actividad enzimática de la β -glucosidasa fue medida mediante el método de Tabatabai (1982), aunque ambas enzimas serán descritas con más detalle en los siguientes apartados.

3.3.1.1. Actividad fosfatasa ácida.

En reacciones catalizadas biológicamente, los reactivos son conocidos como sustratos, mientras que los catalizadores son sustancias macromoleculares de origen natural conocidas como enzimas. La catálisis de la hidrólisis de diversos enlaces, como el enlace éster o éster-fosfórico, se lleva a cabo a través de la actividad de las enzimas hidrolasas. Cualquier enzima de la clase 3 de la Comisión Enzimática (EC) recibe el nombre sistemático de hidrolasa.

Las fosfatasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces monoésteres fosfóricos, liberando fosfato inorgánico. A su vez, la fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) cataliza la siguiente reacción: un monoéster ortofosfórico + H₂O = un alcohol + fosfato, con un pH ácido óptimo. Se trata de hidrolasas que activan la transformación del fósforo orgánico en inorgánico, haciéndolo asimilable por las plantas. Es precisamente este hecho el que les confiere una importancia especial desde el punto de vista agronómico.

El método para medir la actividad enzimática de la fosfatasa se basa en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado cuando el suelo es incubado a 37 °C durante 1 hora con una solución tamponada (pH 6,5 para la fosfomonoesterasa ácida y pH 11 para la alcalina) de p-nitrofenilfosfato. Sin embargo, en este trabajo se alteraron las temperaturas de incubación según lo indicado en la Tabla 4 a fin de estudiar el efecto de la temperatura. El método colorimétrico para medir el p-nitrofenol liberado se basa en el hecho de que las soluciones alcalinas de este compuesto tienen color amarillo (en medio ácido, pH < 5,0 son incoloras).

Procedimiento:

Se coloca la cantidad de suelo (<2mm) equivalente a 0,5 g de suelo seco en un tubo de 10 mL. Se añaden 2 mL de tampón MUB (pH 6,5) (preparado al tomar 200 mL de una solución stock y enrasado a 1 L; solución stock: 12,2 g de trishidroximetilaminometano (THAM), 11,6 g de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico, 6,28 g de ácido bórico y 488 mL de hidróxido de sodio 1 M enrasado a 1 L de agua desionizada) y 0,5 mL de la solución de p-nitrofenil fosfato 0,025 M, se agita el tubo unos segundos para mezclar perfectamente el contenido y se tapa. A su vez se deben realizar controles sin adición de la solución de p-nitrofenil fosfato, que se añadirá después del enfriamiento. Se incuba a la temperatura a estudiar en un baño de agua durante 1 hora. Después, se introduce en la nevera durante 15 minutos.

Una vez enfriado el medio de reacción, se añade en cada tubo, en este orden: 0,5 mL de cloruro de calcio 0,5 M y 2 mL de hidróxido de sodio 0,5 M y se agita para que la suspensión se mezcle completamente. A continuación se añaden 5 mL de agua destilada y se centrifuga (4000 r.p.m. durante 4 minutos). Por último se mide la intensidad del color de los filtrados en un espectrofotómetro a 400 nm (Figura 11).



Figura 11. A la izquierda: preparación de la recta de calibrado con patrones de p-nitrofenol. A la derecha: Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible empleado para mide la intensidad del color de los filtrados, modelo UNICAM UV500. Autor: Ismael García.

El contenido en p-nitrofenol de las muestras se calcula por referencia a una recta de calibrado preparada con patrones de p-nitrofenol (Figura 11). Para preparar la recta patrón, se pipetea 0,5 mL de varias soluciones de p-nitrofenol entre 0 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, añadir 2 mL de agua destilada y, a continuación, se procede a añadir 0,5 mL de cloruro de calcio 0,5 M, 2 mL de hidróxido de sodio 0,5 M, 5 mL de agua destilada, se centrifuga y se mide la absorbancia a 400 nm.

La actividad fosfatasa ácida se calcula usando esta ecuación, calculando a continuación la diferencia entre muestras y controles:

$$\mu\text{moles de p-nitrofenol g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1} = (M/P) \cdot (1/\text{hora}) \cdot fd_1 \cdot fd_2 \cdot fd_3$$

Donde:

M = $\mu\text{g mL}^{-1}$ de p-nitrofenol en el extracto, según la recta de calibración.

P = g de suelo húmedo.

$fd_1 = 1 \mu\text{mol p-nitrofenol} / 139 \mu\text{g p-nitrofenol}$.

$fd_2 = 100 \text{ g suelo} / (100 - \text{Humedad}) \text{ g de suelo seco}$.

$fd_3 = \text{factor de dilución}$; sólo si ha sido necesaria la dilución para la lectura.

3.3.3.2. Actividad β -glucosidasa.

La catálisis de la hidrólisis de los enlaces glicosilo y O-glicosilo se deben a la acción de las hidrolasas. Las glucosidasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de compuestos de glucosilo, sustancias que contienen un grupo derivado de una forma cíclica de glucosa o un derivado de ésta. A su vez la actividad de la β -glucosidasa consiste en catalizar la hidrólisis de residuos terminales no reducidos de β -D-glucosa, liberando β -D-glucosa según la siguiente reacción: $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{36} + 6\text{H}_2\text{O} = 7 \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (β -D-glucosa).

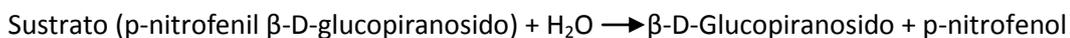
Por tanto, la enzima β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) es una hidrolasa que interviene en el ciclo del carbono y específicamente actúa en la hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos de las grandes cadenas de carbohidratos. Eivazi y Zakariah (1993) demostraron que las hidrólisis de estos sustratos juegan un papel importante en la obtención de energía para los microorganismos del suelo. Estos mismos investigadores demostraron en 1990 que esta enzima podía ser inhibida por la presencia de metales pesados, componentes tóxicos, etc.

Procedimiento:

El método utilizado toma como referencia el estudio de Tabatabai (1982). Se basa en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol obtenido por la acción de la β -glucosidasa después de incubar el suelo con el sustrato β -D-glucopiranosido en medio tamponado a pH 6,5. La incubación se lleva a cabo a 37 °C durante 1 hora, aunque en este estudio dicha

temperatura ha sido altera según las necesidades, y el p-nitrofenol liberado se determina después de la adición de cloruro de calcio y tampón THAM pH 12.

La reacción del ensayo enzimático es la siguiente:



Se pesan 0,5 g de suelo en tubos de 10 mL. Se añade 2mL de disolución tampón MUB (pH 6,5) (preparado al tomar 200 mL de una solución stock y enrasado a 1 L; solución stock: 12,2 g de THAM, 11,6 g de ácido maleico, 14 g de ácido cítrico, 6,28 g de ácido bórico y 488 mL de hidróxido de sodio 1 M enrasado a 1 litro de agua destilada) y 0,5 mL de la solución de sustrato p-nitrofenil β -D-glucopiranosido 0,025 M. Se deben realizar controles a los que se le añadirán los mismos reactivos que a las muestras, excepto que la solución de sustrato se añade después del enfriamiento en nevera. Se tapan los tubos y se incuban las muestras y controles en un baño de agua a la temperatura de estudio durante 1 hora. A continuación se deja enfriar en nevera durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 0,5 mL de cloruro de calcio 0,5 M, 2 mL de solución extractante (12,2 g de THAM, enrasar a pH 12 con hidróxido de sodio 0,5 M y enrasar a un 1 L con agua destilada) y 5 mL de agua destilada. Para acabar, se centrifuga durante 4 minutos a 4000 rpm y se mide la absorbancia de los extractos a 400nm.

El contenido en p-nitrofenol de las muestras se calcula por referencia a una recta de calibrado preparada con patrones de p-nitrofenol. Para preparar la recta, pipetear 0,5 mL de varias soluciones de p-nitrofenol entre 0 y 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, añadir 2 mL de agua destilada y, a continuación, se procede a añadir 0,5 mL de cloruro de calcio 0,5 M, 2 mL de solución extractante THAM pH 12, 5 mL de agua destilada, se centrifuga y se mide la absorbancia a 400 nm.

Con este valor se aplican los factores de conversión siguientes para calcular la actividad neta, calculando la diferencia entre muestras y controles:

$$\mu\text{moles de p-nitrofenol g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1} = (M/P) \cdot (1/\text{hora}) \cdot fd_1 \cdot fd_2 \cdot fd_3$$

Donde:

M = $\mu\text{g mL}^{-1}$ de p-nitrofenol en el extracto, según la recta de calibración

P = g de suelo húmedo

$fd_1 = 1 \mu\text{mol p-nitrofenol} / 139 \mu\text{g p-nitrofenol}$

$fd_2 = 100 \text{ g suelo} / (100\text{-humedad}) \text{ g suelo seco}$

$fd_3 =$ factor de dilución; sólo si ha sido necesaria la dilución para la lectura.

3.4. Análisis estadístico.

El ajuste de los datos a una distribución normal para todas las propiedades analizadas fue verificado con el test Kolmogorov-Smirnov. La separación de medias fue realizada según la prueba de Levene a $P < 0,05$, asumiendo varianzas iguales. Para evaluar el efecto de la temperatura para cada actividad enzimática en cada parcela de estudio, se efectuó un test ANOVA. Todo el análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS (statistical program for the social sciences 19.0).



4. RESULTADOS

Los métodos empleados para conocer la actividad enzimática de la fosfatasa y β -glucosidasa se basan en la determinación colorimétrica y cuantificación del p-nitrofenol de las muestras de suelo. Como resultado de las experiencias realizadas a diferentes temperaturas de incubación se obtuvieron las curvas de actividad para ambas enzimas en cada una de las parcelas de estudio.

4.1. Enzima fosfatasa ácida

Las temperaturas de incubación seleccionadas para observar el efecto de la temperatura sobre la actividad fosfatasa de los suelos de las parcelas de estudio fueron 25, 37, 45, 60, 80 y 90 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, donde se expone la concentración de p-nitrofenol de las muestras, controles y patrones internos frente a la temperatura.

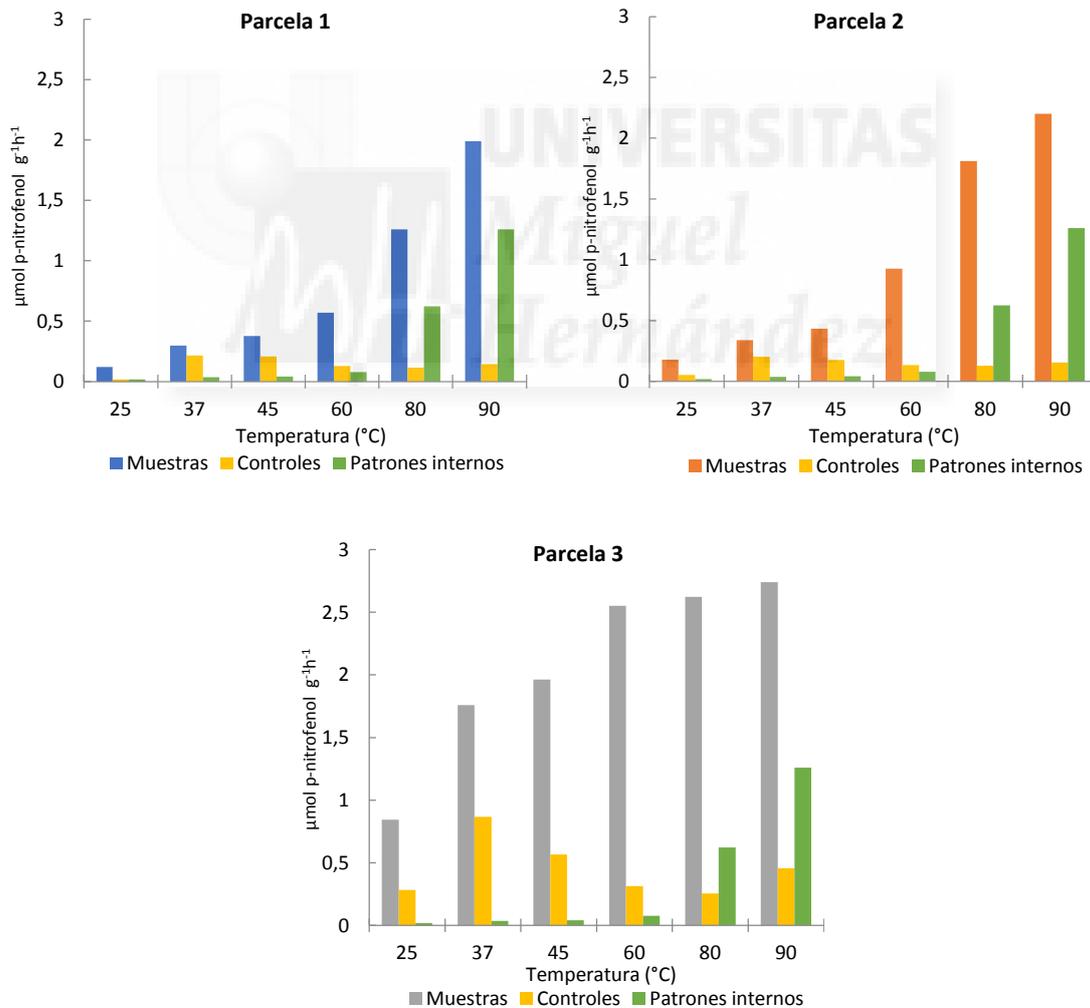


Figura 12. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de p-nitrofenol en las muestras y los controles de los análisis realizados con la fosfatasa ácida en las parcelas de estudio.

En esta figura se observa que la concentración de p-nitrofenol en las muestras aumenta con la temperatura de manera exponencial, alcanzándose la mayor concentración a 90 °C siendo ésta de 1,99 $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la parcela 1, 2,2 $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la parcela 2 y 2,74 $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la parcela 3. Como era de esperar la señal de los controles es menor que la de las muestras en todas las parcelas. Las muestras deben mostrar mayores concentraciones de p-nitrofenol debido a que el sustrato se añade a la solución de suelo antes de la incubación y la refrigeración, mientras que en los controles el sustrato es añadido posteriormente. Sin embargo, a 37 °C la concentración de p-nitrofenol de las muestras y los controles es muy similar, por lo que la diferencia entre ambas serán próximas a cero, sobre todo en las parcelas 1 y 2.

En oposición a lo esperado, los resultados de los patrones internos muestran que la concentración de p-nitrofenol aumenta con la temperatura, siendo muy elevada a 90 °C con 1,26 $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ y mínima a 25 °C con 0,018 $\mu\text{mol p-nitrofenol g}^{-1}\text{h}^{-1}$. Este hecho indica que el sustrato es sensible a la temperatura y se degrada a temperaturas elevadas.

Una vez conocidas las concentraciones de los patrones internos y de las muestras y controles, se calculó la actividad para cada parcela y temperatura de la siguiente manera: $\text{Actividad} = \text{Muestra} - \text{Control} - \text{Patrón interno}$. Esto permitió eliminar la variación sufrida por el p-nitrofenol debido a la temperatura y estimar la actividad debida a las enzimas del suelo durante el periodo de incubación.

Las curvas características de actividad en función de la temperatura para cada parcela de estudio se exponen en la Figura 13. En ella se observa que la parcela 3 (paraguayos) presenta mayor actividad que el resto de parcelas, seguida de la parcela 2 (manzanos) y, en última instancia de la parcela 1 (olivos). En la parcela 1 no se aprecia un descenso significativo de la actividad fosfatasa con la temperatura, mientras que en la parcela 2 se produce un descenso a partir de los 80 °C. Sin embargo, en la parcela 3 puede observarse que la actividad se incrementa conforme aumenta la temperatura hasta llegar al punto óptimo a los 60 °C, una vez sobrepasada esa temperatura la señal obtenida desciende al aumentar la temperatura.

Respecto a la desviación estándar, los datos de la parcela 3 presentan mayor desviación que los del resto de parcelas estudiadas, sobre todo a las temperaturas de 45 °C y 90 °C. Esto sugiere que las actividades fosfatasa calculadas en la parcela 3 a dichas temperaturas presentan cierto grado de incertidumbre, pues los valores de actividad obtenidos varían considerablemente respecto al promedio.

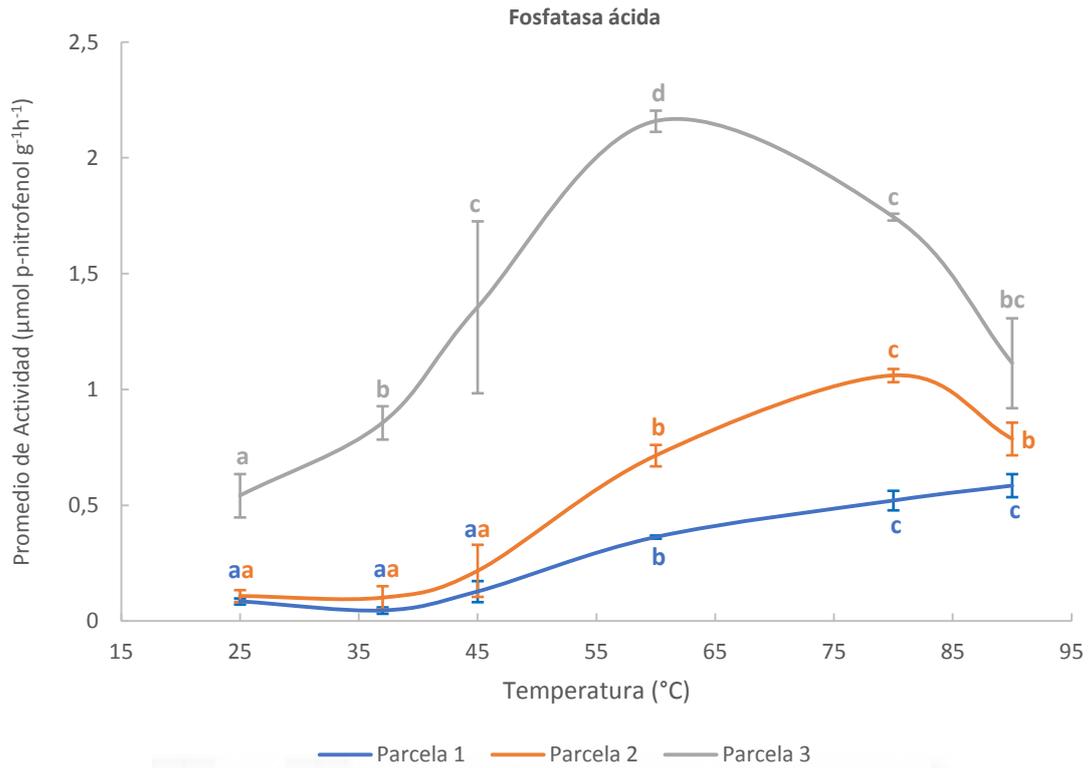
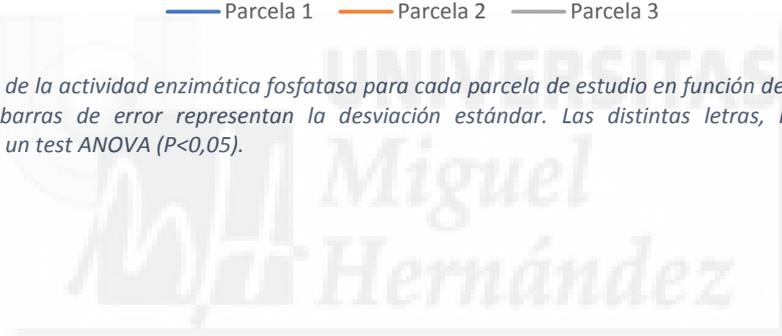


Figura 13. Curvas de la actividad enzimática fosfatasa para cada parcela de estudio en función de la temperatura de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar. Las distintas letras, indican diferencias significativas tras un test ANOVA ($P < 0,05$).



4.2. Enzima β -glucosidasa

Las temperaturas de incubación seleccionadas para observar el efecto de la temperatura sobre la actividad β -glucosidasa de los suelos de las parcelas de estudio fueron 15, 25, 37, 45, 60 y 80 °C. En la Figura 14 se representan las concentraciones de p-nitrofenol de muestras, controles y patones internos obtenidas de las experiencias realizadas a dichas temperaturas.

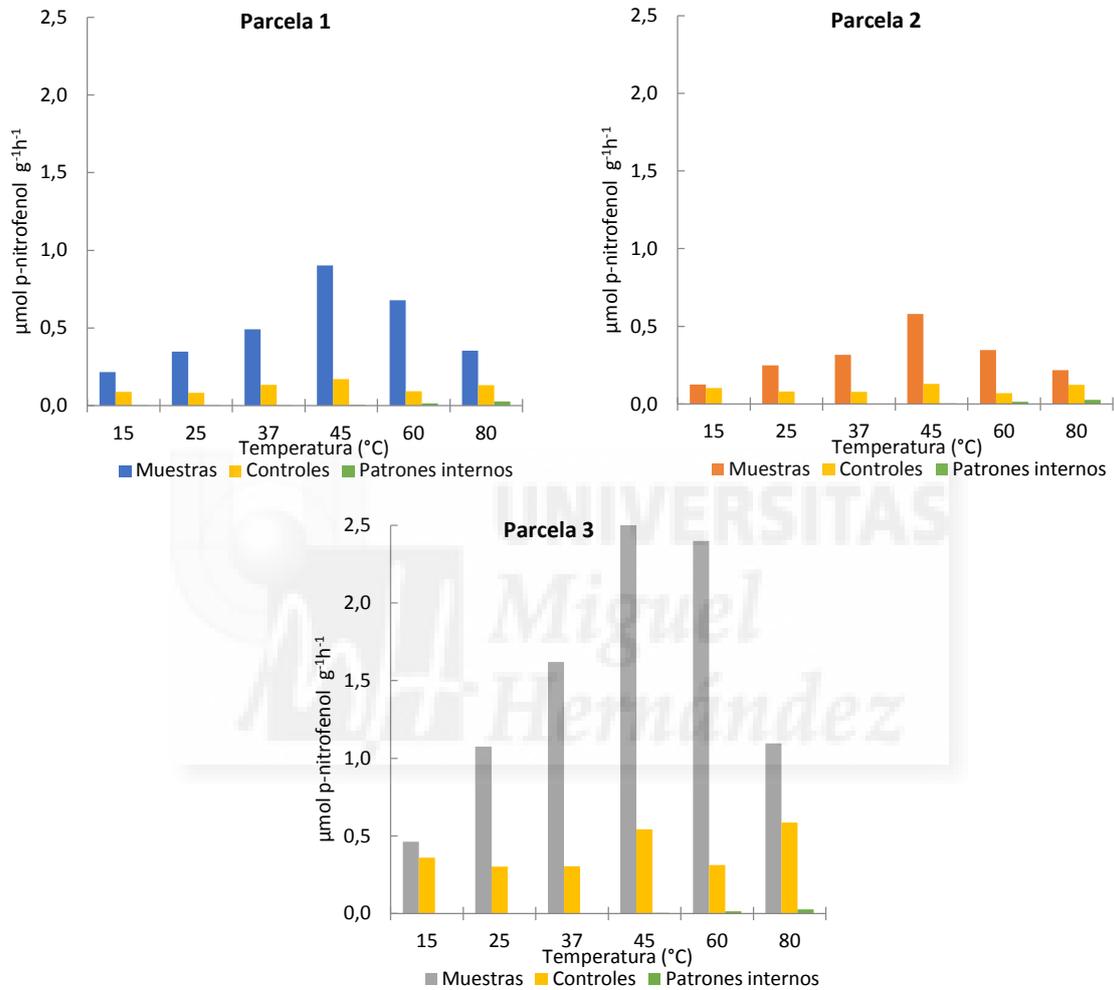


Figura 14. Efecto de la temperatura de incubación sobre la concentración de p-nitrofenol en las muestras y los controles de los análisis realizados con la β -glucosidasa en las parcelas de estudio.

Para todas las muestras la concentración de p-nitrofenol aumenta con la temperatura hasta alcanzar un punto máximo, al partir del cual disminuye conforme se incrementa la temperatura. No obstante, este comportamiento no es tan claro en los controles, donde las medidas a 15 y 80 °C son más elevadas de lo esperado. Al igual que ocurre con las fosfatasa, la concentración de p-nitrofenol es siempre menor en los controles que en las muestras. La mayor concentración de p-nitrofenol se da a 45 °C para las muestras y controles. Por otra parte, todos los patrones internos muestran una señal próxima a cero. Lo que significa que el sustrato a penas se degrada por la acción de la temperatura.

Una vez conocidas las concentraciones de los patrones internos y de las muestras y controles, se calculó la actividad para cada parcela y temperatura de la siguiente manera: Actividad = Muestra – Control – Patrón interno. Esto permitió eliminar la variación sufrida por el p-nitrofenol debido a la temperatura y estimar la actividad debida principalmente a las enzimas del suelo durante el periodo de incubación.

Las curvas características de actividad en función de la temperatura para cada parcela de estudio se exponen en la Figura 15. En ella se representan las actividades β -glucosidasa frente a la temperatura a fin de observar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática y poder determinar la temperatura óptima.

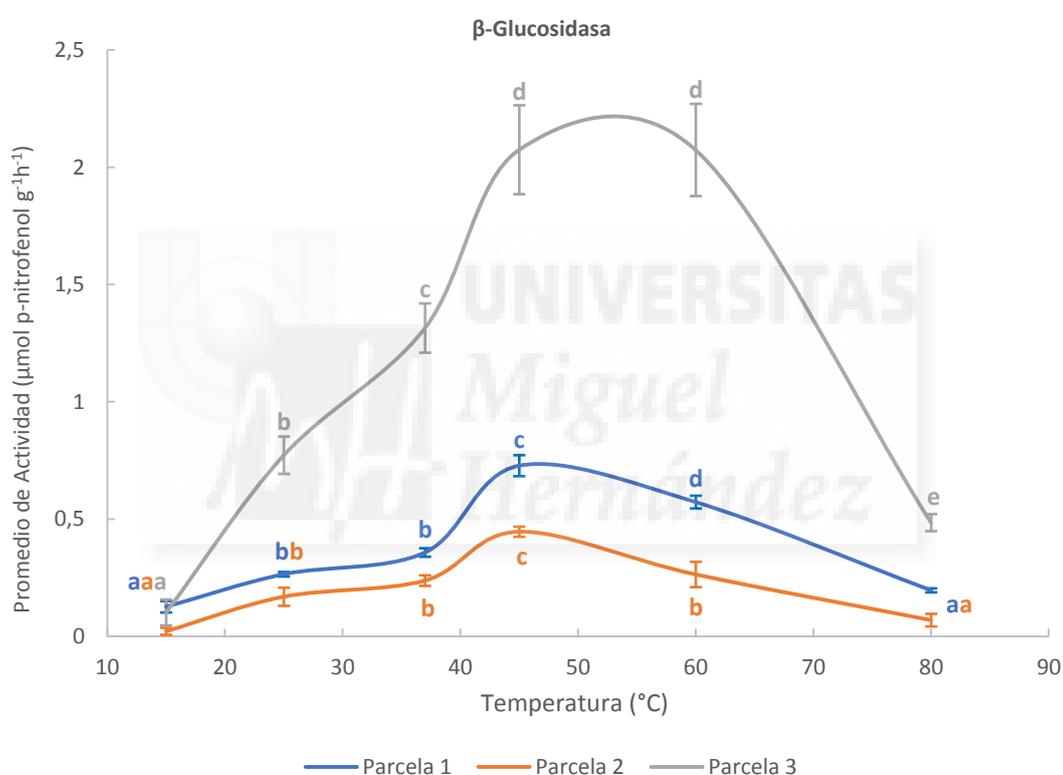


Figura 15. Curvas de actividad enzimática β -glucosidasa para cada parcela de estudio en función de la temperatura de incubación. Las letras, indican diferencias significativas tras el test ANOVA y las barras la desviación estándar.

En la parcela 3 (paraguayos) la actividad enzimática es muy elevada en comparación con el resto de parcelas. En oposición a lo que ocurre con la fosfatasa, la parcela 1 (olivos) presenta mayor actividad β -glucosidasa que la parcela 2 (manzanos). En todas las parcelas estudiadas a partir de 60 °C la actividad disminuye a medida que aumenta la temperatura. El óptimo de actividad probablemente se encuentre entre los 45-60 °C, mientras que esta es muy próxima a cero a 15 y 80 °C. En cuanto a la desviación estándar, la parcela 3 presenta los valores de actividad con mayor incertidumbre, sobre todo a 45 y 60 °C, mientras que para el resto de parcelas todos los resultados están muy próximos al promedio de actividad.

5. DISCUSIÓN

La actividad enzimática registrada en la parcela 3, ubicada en Jumilla, es superior al resto de parcelas estudiadas, tanto en la actividad fosfatasa y β -glucosidasa, este hecho puede deberse principalmente al tipo de manejo agrícola. En ella se llevaba a cabo la aplicación de preparados biodinámicos como enmienda orgánica, la reducción de la labranza al mínimo y no se emplean fertilizantes inorgánicos, pesticidas ni herbicidas, por lo tanto estas prácticas más sostenibles pueden suponer una mejoría en las propiedades del suelo.

El tipo de manejo agrícola puede cambiar las propiedades del suelo, así como afectar a la composición de la microbiota y, por lo tanto, influir sobre las actividades enzimáticas (Gianfreda y Ruggiero, 2006). La reducción de la labranza, incrementa las actividades enzimáticas, la biomasa microbiana y el contenido de materia orgánica en la superficie del suelo (Nannipieri, 1994). Por otro lado, la aplicación de enmiendas orgánicas generalmente aumenta las actividades enzimáticas del suelo estimulando el crecimiento microbiano en ausencia de metales pesados y otros contaminantes (Gianfreda y Ruggiero, 2006). El aumento de la actividad enzimática puede deberse además, a la estabilización de las enzimas extracelulares producidas por la actividad microbiana estimulada por los complejos añadidos con la enmienda orgánica. Sin embargo, estos efectos beneficiosos para el suelo suelen disminuir a largo plazo, con adiciones repetidas de enmiendas orgánicas (Gianfreda y Ruggiero, 2006).

A pesar de ello, para la β -glucosidasa (ver Figura 15) la parcela 1 muestra mayor actividad que la parcela 2, aunque en ésta se lleve aplicando un manejo agrícola sostenible durante más tiempo. Esto puede deberse a que en la parcela 2 el suelo se encuentre saturado de carbonatos (ver Tabla 3), de manera que éstos pueden actuar como factor limitante de la actividad de la β -glucosidasa (Theurl y Buscot, 2010). Además, la parcela 2 posee un alto valor en la conductividad eléctrica, varios estudios corroboran este hecho mostrando correlaciones negativas entre la actividad enzimática y el contenido en sales de suelos irrigados con aguas de baja calidad (Sardinha y col., 2003; Tripathi y col., 2006).

En cuanto a la actividad fosfatasa de las parcelas de estudio (ver Figura 13), la parcela 3 obtuvo mayor concentración para esta actividad que en el resto de parcelas, esto puede deberse al contenido de fósforo y al de materia orgánica en el suelo (ver Tabla 3), diversos autores explican la existencia de fosfatasas secuestradas en los complejos húmicos del suelo. Las enzimas inmovilizadas en la red de moléculas húmicas del suelo son más resistentes a la

desnaturalización térmica y a la degradación de proteínas que las enzimas libres debido generalmente a la reducción de la movilidad molecular (Ladd y Butler, 1975; Burns, 1982; Stotzky, 1986; Nannipieri, 1994; Nannipieri y col., 1996, 2002; Quiquampoix y col., 2002; Gianfreda y Ruggiero, 2006; Nielsen y col., 2006; Gianfreda y Rao, 2011).

Como es sabido, las enzimas son sensibles a la temperatura y muestran una temperatura óptima de funcionamiento. Según los resultados obtenidos no sería posible estimar un valor de temperatura óptima para la actividad fosfatasa, ya que la curva de esta enzima frente a la temperatura difiere en todas las parcelas estudiadas. Algunos autores apuntan que si la sensibilidad a la temperatura de las enzimas es una cuestión importante sería necesario realizar ensayos a múltiples temperaturas (Trasar-Cepeda y col., 2007; Wallenstein y col., 2009). Teniendo en cuenta dicha puntualización, para poder establecer la temperatura óptima de la actividad fosfatasa para las parcelas de estudio sería necesario modificar la metodología empleada, pudiendo inferir en dos puntos principalmente (1) la medición de un rango de temperaturas de ensayo más específico y (2) el incremento en el número de réplicas utilizadas a fin de obtener un óptimo que fuese representativo. No obstante, las temperaturas seleccionadas para la actividad β -glucosidasa sí permiten estimar la temperatura óptima entre los 45-60 °C.

Al igual que son necesarias más temperaturas de ensayo para la actividad de la enzima fosfatasa, también sería necesario un número mayor de muestras para las dos enzimas estudiadas, así como incluir otros tipos de suelo, de cultivos y manejos agrícolas, además sería recomendable realizar el muestreo en diferentes estaciones del año para estudiar el efecto de la temperatura y humedad del suelo (Fenner y col., 2005, Wallenstein y col., 2009). Para realizar este estudio a mayor escala, sería interesante tener en cuenta las diferentes latitudes de las parcelas de estudio. Un mayor número de muestras y controles permitiría tener en cuenta el ruido de fondo en los reactivos de ensayo y obtener valores de absorbancia correctos (DeForest, 2009). A pesar de que este trabajo es un estudio preliminar, a la vista de los resultados obtenidos podemos observar que estos métodos colorimétricos necesitan ser revisados para poder ofrecer datos más fiables en las actividades enzimáticas de los suelos agrícolas.

En relación a ello, De Cesare y col. (2000) observaron que la intensidad del color del p-nitrofenol cambia con el tiempo después de la adición de hidróxido de sodio en los ensayos colorimétricos. Por lo tanto, el tiempo transcurrido entre la adición de hidróxido de sodio y la lectura de absorbancia debe estandarizarse para eliminar esta fuente de variación en los

cálculos de la actividad enzimática. Por otra parte, el tampón MUB también varía en función del tiempo después de la adición de hidróxido de sodio (DeForest, 2009). Estas pueden ser las causas de que la desviación estándar sea elevada para algunas actividades (ver Figuras 13 y 15), pues probablemente pasó el tiempo suficiente desde la preparación hasta la lectura de la medida para que se produjeran alteraciones.

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de las actividades fosfatasa y β -glucosidasa en función de la temperatura, podemos concluir que:

1. Los ensayos enzimáticos actuales determinan las actividades enzimáticas a 37 °C, sin estimar la actividad potencial o real.
2. La parcela de estudio con mayor actividad enzimática fue la parcela 3, la parcela ubicada en Jumilla que lleva a cabo un manejo agrícola correspondiente a la agricultura biodinámica durante más de 18 años.
3. La enzima β -glucosidasa obtuvo su máxima actividad entre los 45-60 °C de temperatura.
4. La actividad enzimática de la β -glucosidasa varió en función de la temperatura real (18-22 °C) y la óptima (45-65 °C).
5. La actividad fosfatasa no mostró un comportamiento acorde para poder estimar una temperatura óptima en los suelos de estudio.
6. Por tanto, podemos asegurar que para los suelos agrícolas de estudio, bajo dichas condiciones ambientales y sometidos a estos manejos agrícolas establecidos, la actividad β -glucosidasa mostró un óptimo para las temperaturas comprendidas entre 45-65 °C, muy lejos de encontrarse a 37 °C como explican los protocolos establecidos.

La dirección futura de la investigación enzimática en el suelo es seguramente hacia estudios proteogenómicos combinados (Nannipieri, 2006), que proporcionarán nuevas ideas sobre el origen de las enzimas medidas. De hecho, el enfoque metagenómico puede revelar genes potenciales que codifican enzimas que catalizan las reacciones diana, mientras que sólo la transcriptómica y la proteómica pueden evaluar los niveles reales de expresión enzimática e indicar qué enzimas pueden usarse como indicadores ecológicos del suelo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Allison, S.D. (2005). Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. *Ecology Letters*, 8, 626-635.

Allison, S.D., Treseder, K.K. (2008). Warming and drying suppress microbial activity and carbon cycling in boreal forest soils. *Global Change Biology*, 14, 2898-2909.

Allison, S.D., Wallestein, M.D., Brandford, M.A. (2010). Soil-carbon response to warming dependent on microbial physiology. *Nature Geoscience*, 3, 336-340. Disponible en internet: <http://dx.doi.org/10.1038/ngeo846>

Anderson, T.H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98, 285-293.

Aon, M.A., Colaneri, A.C. (2001). Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 18(3), 255-270.

Arshad, M.A., Martin, S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 153–160.

Baldrian, P., Snajdr, J., Merhautova, V., Dobiasova, P., Cajthaml, T., Valaskova, V. (2012). Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biology and Biochemistry*, 56, 60-68.

Baum, C., Leinweber, P., Schlichting, A. (2003). Effects of chemical conditions in re-wetted peats temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology*, 22, 167-174.

Bezdicsek, D.F., Papendick, R.I., Lal, R. (1996). Introduction: Importance of soil quality to health and sustainable land management. *Methods for assessing soil quality*, 1-8.

Blagodatskaya, E., Blagodatsky, S., Khomyakov, N., Myachina, O., Kuzyakov, Y. (2016). Temperature sensitivity and enzymatic mechanisms of soil organic matter decomposition along an altitudinal gradient on Mount Kilimanjaro. *Scientific Reports*, 6. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1038/srep22240>.

Bowles, T.M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F., Jackson, L.E. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 252-262.

Burger, M., Jackson, L.E. (2003). Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(1), 29-36.

Burns, R.G. (1982). Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 423–427.

Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216-234.

Buyanovsky, G.A., Aslam, M., Wagner, G.H. (1994). Carbon turnover in soil physical fractions. *Soil Science Society of America Journal*, 58(4), 1167-1173.

Cannell, R.Q., Hawes, J.D. (1994). Trends in tillage practices in relation to sustainable crop production with special reference to temperate climates. *Soil and Tillage Research*, 30(2), 245-282.

Conn, C., Dighton, J. (2000). Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 489-496.

Culman, S.W., Young-Mathews, A., Hollander, A.D., Ferris, H., Sánchez-Moreno, S., O'Geen, A.T., Jackson, L.E. (2010). Biodiversity is associated with indicators of soil ecosystem functions over a landscape gradient of agricultural intensification. *Landscape ecology*, 25(9), 1333-1348.

Davidson, E.A., Janssens, I.A., Luo, Y. (2006). On the variability of respiration in terrestrial ecosystems: moving beyond Q10. *Global Change Biology*, 12(2), 154-164. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01065.x>.

Davidson, E.A., Janssens, I.A. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature*, 440(7081), 165. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04514>.

De Cesare, F., Garzillo, A.M.V., Buonocore, V., Badalucco, L. (2000). Use of sonication for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6), 825-832.

DeForest, J.L. (2009). The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1180-1186.

Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. *Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management*. Marcel Dekker, New York, 95-125.

Dick, R.P. (1997). Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*, CAB International, Wallingford, UK, 121-156.

Díez, J.A. (1982). Consideraciones sobre la utilización de la técnica extractora de Burriel-Hernando para la evaluación del P asimilable en suelos. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 41(2), 1345-1353.

- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1977).** Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9(3), 167-172. Disponible en Internet: [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(77\)90070-0](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(77)90070-0).
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1988).** Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1990).** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(7), 891-897.
- Eivazi, F., Zakaria, A. (1993).** β -Glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Agriculture, ecosystems and environment*, 43(2), 155-161.
- Esquinas, J. (2013).** Biodiversidad y seguridad. En seguridad alimentaria y seguridad global. Instituto español de Estudios Estratégicos. Ministerio de Defensa.
- Estévez A., Vera J.A., Alfaro P., Andreu, J.M., Tent-Manclús J.E., Yébenes A. (2004).** Geología de la provincia de Alicante. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*, 12(1), 2-15. Disponible en Internet: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/13473/1/Estevéz_Geología_Alicante.pdf
- FAO (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación). (2009).** Guía para la descripción de suelos. Anexo 1. Explicación de los regímenes de temperatura del suelo. Cuarta edición. Página 90.
- Fenner, N., Freeman, C., Reynolds, B. (2005).** Observations of a seasonally shifting thermal optimum in peatland carbon-cycling processes; implications for the global carbon cycle and soil enzyme methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1814-1821.
- Fierer, N., Schimel, J.P. (2003).** A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Science Society of America Journal*, 67(3), 798-805.
- Finzi, A.C., Sinsabaugh, R.L., Long, T.M., Osgood, M.P. (2006).** Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperature forest. *Ecosystems*, 9(2), 215-226.
- Fraterrigo, J.M., Balsler, T.C., Turner, M.G. (2006).** Microbial community variation and its relationship with nitrogen mineralization in historically altered forests. *Ecology*, 87(3), 570-579.
- García, C., Hernández, T. (2000).** Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. I.S.B.N.: 84-605-9821-7. Depósito legal: MU-458-2000. Imprime: Tipografía San Francisco, S.A. Páginas 15-23.
- Gee, G.W., Bauder, J.W. (1986).** Particle-size analysis. *Methods of soil analysis: Part 1—Physical and mineralogical methods*, 383-411.

- George, T.S., Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2005).** Behaviour of plant-derived extracellular phytase upon addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 977-988.
- German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber, C.L., Rinkes, Z.L., Allison, S.D. (2011).** Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7), 1387-1397.
- Gianfreda, L., Ruggiero, P. (2006).** Enzyme activities in soil. In *Nucleic acids and proteins in soil* (pp. 257-311). Springer Berlin Heidelberg.
- Gianfreda, L., Rao, M.A. (2011).** Stabilising enzymes as synthetic complexes. *Methods of soil enzymology*, 9, 319-369.
- Granatstein, D., Bezdicsek, D.F. (1992).** The need for a soil quality index: Local and regional perspectives. *American Journal of Alternative Agriculture*, 7(1-2), 12-16.
- Harris, S.L., Clark, D.A. (1996).** Effect of high rates of nitrogen fertiliser on white clover growth, morphology, and nitrogen fixation activity in grazed dairy pasture in northern New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39(1), 149-158.
- Henry, H.A., Juarez, J.D., Field, C.B., Vitousek, P.M. (2005).** Interactive effects of elevated CO₂, N deposition and climate change on extracellular enzyme activity and soil density fractionation in a California annual grassland. *Global Change Biology*, 11(10), 1808-1815.
- Herbien, S.A., Neal, J.L. (1990).** Soil pH and phosphatase activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21(5-6), 439-456.
- IUSS (Unión internacional de la ciencia del suelo). (2007).** Grupo de Trabajo WRB. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO, Roma (consultado 25/05/17). Disponible en Internet: www.fao.org/3/a-a0510s.pdf
- Kieft, T.L., Ringelberg, D.B., White, D.C. (1994).** Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3292-3299.
- Kotroczó, Z., Veres, Z., Fekete, I., Krakomperger, Z., Tóth, J.A., Lajtha, K., Tóthmérés, B. (2014).** Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 237-243.
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A. (1975).** Humus-enzyme systems and synthetic organic polymer-enzyme analogs. In: Paul EA, McLaren AD (eds) *Soil biochemistry*, 4, 143-194.
- Lellei-Kovács, E., Kovács-Láng, E., Botta-Dukát, Z., Kalapos, T., Emmett, B., Beier, C. (2011).** Thresholds and interactive effects of soil moisture on the temperature response of soil respiration. *European Journal of Soil Biology*, 47(4), 247-255.

MAGRAMA (Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente). (2009). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado. NIPO: 280-12-100-8.

Menten, L., Michaelis, M.I. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *BiochemischesZeitschrift* 49, 333-369.

Mrabet, R., Saber, N., El-Brahli, A., Lahlou, S., Bessam, F. (2001). Total, particulate organic matter and structural stability of a Calcixeroll soil under different wheat rotations and tillage systems in a semiarid area of Morocco. *Soil and Tillage Research*, 57(4), 225-235.

Nannipieri, P. (1994). The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. *Soil biota: management in sustainable farming systems*, 238-244.

Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P. (1996). Humus and enzyme activity. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, 293-328.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the environment*. Marcel Dekker, New York, 1-33.

Nannipieri, P. (2006). Role of stabilized enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. *Nucleic acids and proteins in soil*, 75-94.

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Marinari, S. (2012). Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and fertility of soils*, 48(7), 743-762.

Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. (1990). *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach* (Vol. 20). Sunderland: Sinauer.

Nielsen, K.M., Calamai, L., Pietramellara, G. (2006). Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components. In *Nucleic acids and proteins in soil* (pp. 141-157). Springer Berlin Heidelberg.

Pala, M., Harris, H.C., Ryan, J., Makboul, R., Dozom, S. (2000). Tillage systems and stubble management in a mediterranean-type environment in relation to crop yield and soil moisture. *Experimental Agriculture*, 36(2), 223-242.

Pascual, J.A., Hernandez, T., Garcia, C., Ayuso, M. (1998). Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. *Bioresource Technology*, 64(2), 131-138.

Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H. (2002). Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity. *Enzymes in the environment*. Marcel Dekker, New York, 285-306.

Razavi, B.S., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. (2016). Temperature selects for static soil enzyme systems to maintain high catalytic efficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 15-22. Disponible en internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.018>.

Sardans, J., Peñuelas, J., Estiarte, M. (2008). Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology*, 39(2), 223-235.

Sardinha, M., Müller, T., Schmeisky, H., Joergensen, R.G. (2003). Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology*, 23(3), 237-244.

Sinsabaugh, R.L., Moorhead, D.L. (1994). Resource allocation to extracellular enzyme production: a model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil biology and biochemistry*, 26(10), 1305-1311.

Sinsabaugh, R.L., Carreiro, M.M., Repert, D.A. (2002). Allocation of extracellular enzymatic activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry*, 60(1), 1-24.

Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Gartner, T.B. (2008). Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology letters*, 11(11), 1252-1264.

Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial (1996-2009). S. Rivas-Martínez and S. Rivas-Sáenz, Centro de Investigaciones Fitosociológicas, España (consultado 9/5/2017). Disponible en Internet: <http://www.ucm.es/info/cif>

Skujins, J., Burns, R.G. (1976). Extracellular enzymes in soil. *CRC critical reviews in microbiology*, 4(4), 383-421.

Speir, T.W., Cowling, J.C. (1991). Phosphatase activities of pasture plants and soils: relationship with plant productivity and soil P fertility indices. *Biology and Fertility of Soils*, 12(3), 189-194.

Stone, M.M., Weiss, M.S., Goodale, C.L., Adams, M.B., Fernandez, I.J., German, D.P., Allison, S.D. (2012). Temperature sensitivity of soil enzyme kinetics under N-fertilization in two temperate forests. *Global Change Biology*, 18(3), 1173-1184. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02545.x>.

Stotzky, G. (1986). Influence of soil mineral colloids and metabolic processes, growth adhesion, and ecology of microbes and viruses. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes, (interactionsofs)*, 305-428.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, 1(4), 301-307.

Tabatabai, M.A. (1982). Soil enzymes. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilan2)*, 903-947.

- Theuerl, S., Buscot, F. (2010).** Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biology and Fertility of Soils*, 46(3), 215-225.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F., Leirós, M.C. (2007).** Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 311-319.
- Tripathi, S., Kumari, S., Chakraborty, A., Gupta, A., Chakrabarti, K., Bandyopadhyay, B.K. (2006).** Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. *Biology and fertility of soils*, 42(3), 273-277.
- van Gestel, N.C., Reischke, S., Bååth, E. (2013).** Temperature sensitivity of bacterial growth in a hot desert soil with large temperature fluctuations. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 180-185. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.016>.
- Villányi, I., Füzy, A., Biró, B. (2006).** Non-target microorganisms affected in the rhizosphere of the transgenic Bt corn. *Cereal Research Communications*, 34(1), 105-108.
- Walkley, A., Black, I.A. (1934).** An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1), 29-38.
- Wallenstein, M.D., McMahon, S.K., Schimel, J.P. (2009).** Seasonal variation in enzyme activities and temperature sensitivities in Arctic tundra soils. *Global Change Biology*, 15(7), 1631-1639.
- Wallenstein, M., Allison, S.D., Ernakovich, J., Steinweg, J.M., Sinsabaugh, R. (2010).** Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes: a key driver of in situ enzyme activity rates. *Soil enzymology* (pp. 245-258). Springer Berlin Heidelberg.
- Wallenstein, M.D., Haddix, M.L., Lee, D.D., Conant, R.T., Paul, E.A. (2012).** A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, 47, 18-26.
- Williams, A., Hedlund, K. (2013).** Indicators of soil ecosystem services in conventional and organic arable fields along a gradient of landscape heterogeneity in southern Sweden. *Applied soil ecology*, 65, 1-7.
- Yakovchenko, V., Sikora, L.J., Kaufman, D.D. (1996).** A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 21(4), 245-251.
- Zimmermann, M., Bird, M.I. (2012).** Temperature sensitivity of tropical forest soil respiration increase along an altitudinal gradient with ongoing decomposition. *Geoderma*, 187, 8-15. Disponible en Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.04.015>.
- Zornoza R. (2007).** Tesis doctoral. Título: Evaluación de la calidad ambiental en suelos de la provincia de Alicante: Desarrollo y aplicación de diferentes técnicas. Autor: Raúl Zornoza (2007).