

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DE SUELOS

CARLOS ANTONIO ANAYA MERCHANT
(coordinador)



ENES
MM
MORELIA

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS DE SUELOS

CARLOS ANTONIO ANAYA MERCHANT
(coordinador)

Carlos Antonio Anaya Merchant
Pamela Chávez Ortiz
Dainiz Hernández y Hernández
Alberto Morón Cruz
Margarita Ojeda Carrasco
Neftalí Razo Pérez
Yunuen Tapia Torres



ENES
MORELIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD MORELIA
Morelia, 2024

Índice

| | |
|--|-----|
| Presentación | 4 |
| I. Propiedades físicas | 6 |
| 1. Textura del suelo | 7 |
| 2. Distribución de agregados estables | 17 |
| 3. Densidad aparente | 24 |
| 4. Humedad | 31 |
| 5. Color del suelo | 38 |
| II. Propiedades químicas | 44 |
| 6. Salinidad | 45 |
| 7. pH | 52 |
| 8. Carbono orgánico | 60 |
| 9. Capacidad de intercambio catiónico | 68 |
| 10. Amonio y nitrato | 74 |
| 11. Fósforo disponible | 82 |
| III. Biología del suelo | 89 |
| 12. Riqueza y abundancia de microartrópodos del suelo | 90 |
| 13. Aislamiento de microorganismos de muestras ambientales | 97 |
| 14. Extracción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares | 105 |
| 15. Tinción de raíces para la observación y conteo de hongos micorrízicos arbusculares | 110 |
| IV. Procesos microbiológicos | 117 |
| 16. Respiración del suelo | 118 |
| 17. Actividad enzimática en el suelo | 126 |
| Anexos | 136 |
| Tabla de Unidades | 137 |
| Glosario | 138 |
| Bibliografía | 143 |

Presentación

Las ciencias del suelo se caracterizan por su naturaleza experimental y la amplia aplicación del conocimiento en la resolución de problemas prácticos en campo (Field et al., 2011; Brevik et al., 2015). Es por ello por lo que en la enseñanza de esta disciplina se valora mucho el aprendizaje práctico de los alumnos, en donde las teorías y los conceptos abstractos aprendidos en el aula se puedan mostrar y confrontar, se reflexione sobre problemáticas, se explore la naturaleza, se realice experimentación, se adquieran habilidades técnicas y se ejercite el manejo, expresión e interpretación de datos (Barberá y Valdés, 1996; Flores et al., 2009; Hartemink et al., 2014; Jiménez-Álvarez et al., 2019).

El acercamiento a la investigación de las ciencias del suelo por parte de los estudiantes debe tener un componente empírico fuerte, ya que sólo realizando actividades prácticas de campo y laboratorio se pueden adquirir habilidades técnicas y adoptar el uso de buenas prácticas. Lo anterior relacionado con el diseño de experimentos, los métodos de muestreo en campo, los métodos analíticos de laboratorio y el registro, generación e interpretación de datos. Para la realización de actividades prácticas en la docencia es necesario contar con materiales didácticos que reúnan, sintetizen y pongan en un lenguaje adecuado al nivel de estudios la información temática por aprender (Jiménez-Ruiz, 2009; Krzic et al., 2018). En el contexto de este aprendizaje activo, el presente manual es un instrumento que coadyuva e incentiva al aprendizaje de métodos analíticos y la realización de actividades prácticas de laboratorio en cursos introductorios sobre la ciencia del suelo en licenciaturas del área de las ciencias biológicas y del ambiente. El manual tiene como finalidad principal el aprendizaje de métodos analíticos para el estudio de suelos, la adquisición de habilidades técnicas, la apropiación del lenguaje y el ejercicio en la generación, expresión e interpretación de datos. Entre los métodos analíticos que se podrán aprender se incluyen métodos gravimétricos, electroquímicos, valoraciones ácido-base, ópticos, espectrométricos, enzimáticos, entre otros. El presente manual está estructurado en cuatro secciones que se diferencian por la naturaleza de las propiedades de los suelos: físicas, químicas, biológicas y procesos biogeoquímicos. Se decidió esta estructura con la finalidad de que el material pueda ser usado en diferentes asignaturas de las ciencias del suelo o con temas relacionados, en vez de tener una secuencia de temas propios de la didáctica de una asignatura particular. Cada sección está compuesta por capítulos en las que se describen propiedades de los suelos *ad hoc* a ellas y metodologías para su determinación. Se presentan un total de 17 propiedades, las cuales son una muestra representativa de los índices más frecuentemente usados para una caracterización básica del funcionamiento del suelo o de su calidad para un uso (Karlen et al., 1997; Schoenholtz et al., 2000; Lima et al., 2013; Askari y Holden, 2014; Mukherjee y Lal, 2014; Bünemann et al., 2018). Se buscó tener una estructura lógica entre secciones y entre capítulos para que los alumnos puedan ir asociando y enlazando las diferentes propiedades y procesos de los suelos. Persiguiendo fines didácticos, a cada capítulo se le dotó de los siguientes apartados: a) objetivo, donde se señala en propósito del capítulo; b) introducción, donde se define la propiedad a tratar y se describe su importancia en el funcionamiento del suelo; c) método, donde se describen uno o más métodos que permiten analizar el parámetro, este apartado incluye el fundamento teórico, los materiales y equipos que son requeridos para su realización y la explicación del procedimiento;

d) cálculos y/o expresión de datos, en el que se indica cómo reportar los valores obtenidos; e) interpretación de datos, en el que se presenta el ámbito de variación normal de los valores del parámetro, se organizan los valores en niveles jerárquicos, y/o se presentan posibles interpretaciones de los valores con relación a la funcionalidad del suelo; y f) autoevaluación, en la cual el alumno puede corroborar su aprendizaje de los conceptos, los métodos y la realización de cálculos y/o la presentación de datos. Algunos de estos apartados fueron omitidos en ciertos capítulos, porque no se requirieron. Asimismo, se presentan notas al texto para aclarar o profundizar sobre algunos conceptos relevantes, así como para agregar información relevante o dar sugerencias-indicaciones sobre los métodos. También se presenta un glosario del vocabulario técnico que se usa. Cabe mencionar que los métodos que se muestran fueron seleccionados considerando la fiabilidad de sus resultados, su uso en la investigación y su factibilidad para realizarse periódicamente en laboratorios de docencia, de acuerdo con los materiales y equipos que comúnmente se encuentran en éstos.

Se espera que el presente manual sea utilizado como material de apoyo para la planeación y ejecución de actividades prácticas de observación y experimentación diseñadas por profesores y/o alumnos con fines de enseñanza-aprendizaje en sus cursos, y que ayude a fortalecer la formación de profesionistas con mejores hábitos de trabajo y habilidades técnicas.

Carlos Anaya

I. Propiedades físicas

Las propiedades físicas de los suelos son aquellas que resultan de la naturaleza física de los mismos, tales como color, **textura**, **agregación**, porosidad, humedad y densidad (Osman, 2013). Estas propiedades juegan un papel muy importante en el funcionamiento de los suelos ya que influyen sobre diferentes procesos que ocurren en éstos, como aquellos involucrados en el movimiento del agua, aire y nutrientes, la dinámica de los microorganismos, la retención de materia orgánica, el flujo de energía y la estructuración del **suelo** (Brady y Weil, 2013).

Las propiedades físicas de los suelos son estudiadas por la subdisciplina denominada física de suelos, la cual ha desarrollado los conceptos relativos a estas propiedades y analizado la influencia de éstas sobre procesos edáficos (Hillel, 2003). Por ejemplo, esta subdisciplina estudia los mecanismos de agregación de los sólidos del suelo, el movimiento de gases, agua y materiales transportables a través de la matriz del suelo y el intercambio de energía entre el suelo y la atmósfera. La aplicación de la física de suelos se encamina hacia el estudio del manejo adecuado del suelo mediante prácticas de **labranza**, riego, drenaje, aireación, control de **infiltración** y evaporación, regulación de la temperatura y prevención de **erosión** (Hillel, 2003; Brady y Weil, 2013).

En esta sección se presentan algunas propiedades físicas que determinan procesos asociados al flujo de energía y a la dinámica del agua, la materia orgánica y los nutrientes en el suelo; y que están relacionadas o influyen sobre las propiedades químicas y biológicas del suelo, las cuales se retoman en otras secciones del presente manual.



Textura del suelo

Carlos Antonio Anaya Merchant

1

En este capítulo se espera que el alumno comprenda el concepto de textura del suelo, reconozca su importancia, aprenda el método del hidrómetro para determinar la textura del suelo y practique estimar las clases texturales mediante una prueba al tacto.

I. Introducción

Los suelos están constituidos por diferentes componentes que interactúan entre sí, como partículas minerales, **materia orgánica**, agua, aire y organismos vivos. Las partículas minerales son generalmente el componente más abundante. Estas partículas difieren en su tamaño y en sus propiedades físicas y químicas. De acuerdo con su tamaño, las partículas de la **fracción fina del suelo** se han clasificado en arenas, limos y arcillas; y a la proporción relativa (o porcentaje) de estas partículas en un suelo se le denomina textura.

El tamaño de las partículas desciende de las arenas a las arcillas. Las arenas tienen un diámetro entre 0.2 y 2 mm, los limos miden entre 0.002 y 0.2 mm y las arcillas son menores a 0.002 mm. Las arenas y los limos tienen una composición química similar a la del material del cual derivan (i.e. material parental), por lo que son considerados minerales primarios. En contraste, las arcillas se forman comúnmente a partir del **intemperismo químico** de los minerales primarios, por lo que su composición química es diferente a la de éstos, y se les denominan minerales secundarios (Sposito, 2008). Dadas sus diferencias en tamaño y composición química, las arcillas se distinguen de los limos y las arenas por tener una mayor **superficie específica** (cociente del área superficial del sólido entre su masa [m²/g]) y por tener una carga neta superficial negativa, lo que les confiere la capacidad de retener e intercambiar cationes con la **solución** del suelo (Hillel, 2003; White, 2006). La **fracción de arcilla** puede comprender diferentes minerales, incluyendo: **minerales de arcilla**, óxidos e hidróxidos de aluminio y hierro y **silicatos** amorfos como **alófano** e **imogolita**, cada uno con características propias (Brady y Weil, 2013). La textura se ha clasificado en 12 clases, de acuerdo con el triángulo de texturas del suelo (Figura 1.1). En esta clasificación, los suelos con más de 60% de arcillas tienen una textura arcillosa y los suelos con más de 90% de arenas tienen una textura arenosa.

Dadas las características propias de cada tamaño de partícula, la textura determina la porosidad, la superficie específica y la capacidad de intercambio de cationes de los suelos, por lo cual juega un papel importante en la dinámica del agua, los gases, los nutrientes y la materia orgánica en estos (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, los suelos con

Por convención la textura se analiza en la fracción fina del suelo, la cual está conformada por las partículas sólidas menores a 2 mm.

El intemperismo químico (i.e. transformación química de los minerales del suelo por la interacción con el ambiente) es uno de los procesos más importantes en la formación del suelo debido a que determina el tamaño y la química de las partículas minerales del suelo.

textura arcillosa tienen una superficie específica y una capacidad de intercambio de cationes mayor que la de los suelos con textura arenosa, lo que les confiere un mayor potencial para retener agua, cationes y materia orgánica. En contraste, los suelos arenosos tienen poros de mayor tamaño que los arcillosos, lo que permite que el drenaje del agua y el intercambio de gases a través de su matriz sean más rápidos. Dada su importancia, la textura es un parámetro que se mide de manera rutinaria para evaluar el funcionamiento de los suelos, especialmente cuando se quiere analizar e interpretar la estructura del suelo y la dinámica del agua, los nutrientes y la materia orgánica en estos.

Las arenas, limos y arcillas tienen superficies específicas de alrededor de 0.1, 1 y 4-750 m²/g, respectivamente, por lo que las diferencias en superficie específica entre tamaños de partículas pueden ser de hasta tres órdenes de magnitud.

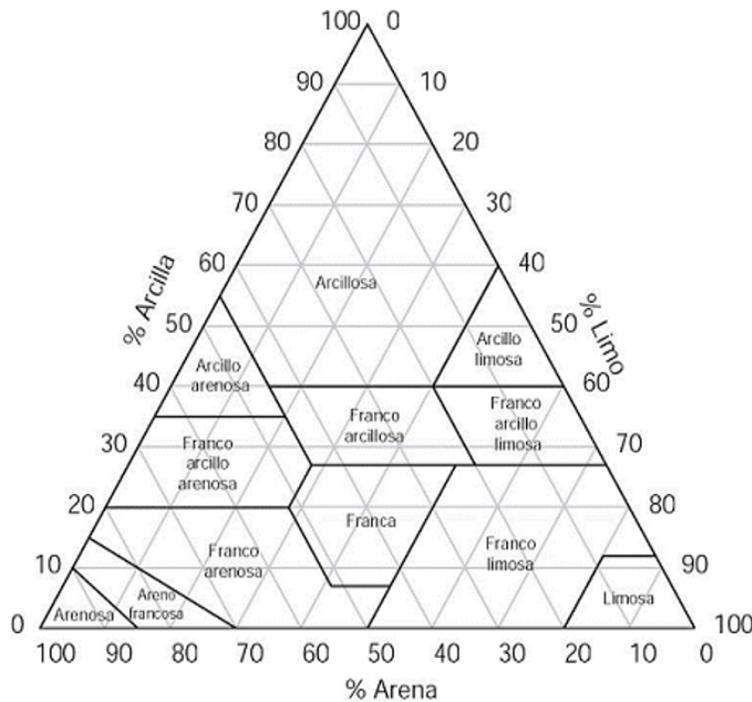


Figura 1.1. Triángulo de texturas del suelo. Fuente: Soil Survey Staff (2014).

Se han desarrollado diversos métodos para determinar la textura del suelo (véase Klute, 1986; van Reeuwijk, 1993; Soil Survey Staff, 2014); entre ellos, el método del hidrómetro es uno de los más usados debido a su relativa sencillez y sus apropiados resultados para una descripción general. Asimismo, se han desarrollado métodos menos rigurosos que permiten una primera y rápida aproximación a las clases de textura sin necesidad de equipos de laboratorio; estos métodos están basados en pruebas al tacto en las que se analizan diferentes características físicas del suelo. A continuación, se describirán estos dos métodos.

Los poros del suelo se han clasificado de acuerdo con su tamaño en: gruesos (>50 μm), medianos (10 - 50 μm), finos (0.2 - 10 μm) y muy finos (<0.2 μm).

II. Métodos

2.1. Método del hidrómetro

2.1.1. Principio

El método del hidrómetro o de Bouyoucos se basa en la ley de Stokes, la cual indica que las partículas sólidas de una suspensión se asientan a una tasa proporcional a su tamaño (Soil Survey Staff, 2014). Las arenas se asientan más rápido que los limos, y éstos a su vez se sedimentan más rápido que las arcillas. Conforme se asientan las partículas, ocurren cambios proporcionales en la densidad de la **suspensión**, de tal forma que a partir de estos cambios de densidad se puede estimar la cantidad de partículas minerales de cierto tamaño que se han asentado (o que permanecen en suspensión) en un tiempo determinado, lo que a su vez permite estimar la proporción de los diferentes tamaños de partículas minerales de un suelo. Existen distintas variantes del método del hidrómetro, el presente método está basado en Norma Mexicana 021 (Semarnat, 2002) y en Soil Survey Staff (2014).

El hidrómetro sirve para medir la densidad específica de un líquido. Su funcionamiento se basa en el concepto de flotabilidad, y se gradúa con base en la gravedad o densidad específica de las soluciones (g/L).

2.1.2. Materiales y equipos para el método de hidrómetro

| Materiales |
|---|
| Vasos de precipitado de 500 ml de cuello alto (uno por muestra) |
| Probetas de 1 L (una por muestra) |
| Varilla de agitación de plástico para probetas de 1 L |
| Botella de plástico con tapa de 250 ml para agitación (una por muestra) |
| Tamiz de 2 mm de amplitud de malla (No. 10) |
| Equipos |
| Hidrómetro estándar (ASTM No. 152 H, con escala en g/L) |
| Agitador eléctrico para dispersión (con motor de 10,000 rpm) |
| Termómetro |
| Agitador recíproco u orbital |
| Balanza |
| Baño maría |
| Campana de extracción |
| Horno de secado |

2.1.3. Reactivos para el método de hidrómetro

| Reactivo | Preparación |
|-----------------------|-------------|
| Agua destilada | N. A. |
| Agua oxigenada al 30% | N. A. |

| | |
|--|--|
| Alcohol amílico | N. A. |
| Hexametáfosfato de sodio (Na_3PO_3) al 5% p/v. | Disolver 50 g de Na_3PO_3 en agua destilada y aforar a 1 L |

N. A. = no aplica.

2.1.4. Procedimiento

- a) *Tamizado*. Tamiza una alícuota de suelo secado al aire de aproximadamente 200 g a través de una malla de 2 mm de diámetro para obtener la fracción fina del suelo.
- b) *Eliminación de materia orgánica*. Pesa 80 g de suelo de textura fina o 130 g de suelo de textura gruesa en un vaso de precipitado de 500 ml. Dentro de una campana de extracción, agrega lentamente al suelo 40 ml de agua oxigenada al 30% y deja reaccionar, preferentemente en baño maría a 40 °C para acelerar el proceso. La muestra presentará efervescencia debido a la oxidación de la materia orgánica. Una vez evaporada el agua, agrega otros 40 ml de agua oxigenada, y observa la reacción. Si hay efervescencia repite el procedimiento hasta que ya no la haya. Este proceso puede llevar un día de trabajo o más dependiendo de la concentración de materia orgánica. Posteriormente seca la muestra en horno a 105 °C hasta peso constante para deshidratar la muestra.
- c) *Dispersión de las partículas minerales*. Pesa 50 g de suelo de textura fina o 100 g de suelo de textura gruesa en un vaso de plástico con tapa de 250 ml. Adiciona 120 ml de agua destilada y 120 ml de la solución de hexametáfosfato de sodio. Cierra la botella de plástico, colócala de manera horizontal en un agitador mecánico y agita por 24 h. Posteriormente transfiere toda la muestra al vaso del agitador eléctrico, para ello se puede emplear agua destilada con una piseta para acarrear el material. Revuelve la muestra en el agitador eléctrico durante 5 min para que se termine de dispersar el suelo.
- d) *Preparación de la lectura*. Pasa todo el contenido del vaso a la probeta de 1 L, enjuagando el vaso con agua destilada. Agrega agua destilada hasta completar 1 L con el hidrómetro dentro de la probeta. Saca el hidrómetro de la probeta y espera 1 min para que la suspensión se equilibre.
- e) *Lectura con el hidrómetro*. Introduce la varilla de agitación dentro de la probeta y agita la suspensión vigorosamente durante 1 min, sujetando la probeta por la parte baja para prevenir que se caiga. Asegúrate de que durante la agitación se muevan las arenas que se encuentran en el fondo de la probeta. Si en la superficie de la suspensión se forma espuma, agrega unas gotas de alcohol amílico y vuelve a agitar. Una vez agitada la muestra, toma el tiempo con un cronómetro y anota las lecturas del hidrómetro a los 40 s y a las 2 h. Estos tiempos pueden ser modificados de acuerdo con las necesidades particulares del análisis (Soil Survey Staff, 2014). Para

Se elimina la materia orgánica para que haya una mejor dispersión de las partículas minerales. Si el suelo es rico en otros aglutinantes, como carbonatos y óxidos de hierro libres, que pueden reducir la dispersión de los minerales, se recomienda usar otros tratamientos (ver Soil Survey Staff, 2014).

Se considera peso constante cuando el peso del suelo varía en menos de 0.1% después de dos pesadas continuas a intervalos de 2 h de secado en horno a 105 °C.

Si no hay una completa dispersión de las partículas, éstas se mantienen agregadas, su tasa de sedimentación cambia y los resultados son erróneos.

tomar una lectura, se coloca el hidrómetro lenta y cuidadosamente sobre la suspensión 20 s antes de la medición, y en el tiempo adecuado se lee la parte superior del menisco en la escala del hidrómetro (Figura 1.2).

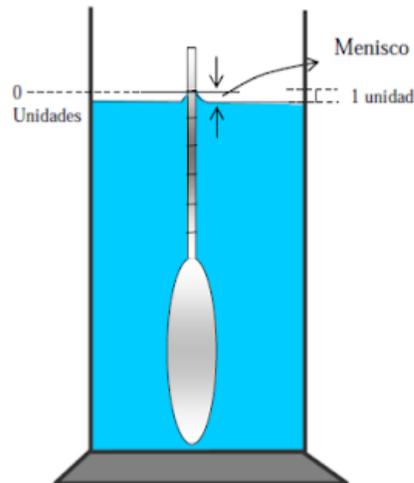


Figura 1.2. Lectura del hidrómetro.

Después de la medición se extrae el hidrómetro y se toma la temperatura de la suspensión con un termómetro. Se limpia el hidrómetro y se seca para la siguiente medición a las 2 h.

Si entre la primera y la segunda lectura se observa que la suspensión presenta flóculos (i.e. partículas aglutinadas), los resultados serán incorrectos y se tendrá que repetir el proceso.

2.1.5. Cálculos

En caso de que la temperatura de la suspensión sea distinta a 19.5 °C al momento de la lectura, se deben corregir las mediciones del hidrómetro mediante la suma o resta de 0.36 unidades al valor de la medición por cada grado arriba o abajo de 19.5 °C.

El porcentaje de limos y arcillas corresponde a la multiplicación de la lectura a los 40 s por un valor de dos; por lo tanto, el porcentaje de arenas se establece restando esta cantidad al 100%. El porcentaje de arcillas se determina multiplicando la lectura tomada a las dos horas por un valor de dos. El porcentaje de limos se obtiene por diferencia (100 - %arenas - % arcillas). Cuando se usan 100 g de suelo no se debe multiplicar los valores de las lecturas por dos ya que el hidrómetro está calibrado en porcentajes considerando 100 g de suelo.

Identifica la clase de textura por medio de la comparación de los valores de arena, limo y arcilla en el triángulo de texturas (Figura 1.1). Para ello, primero ubica el porcentaje de arenas en la escala porcentual presente en la base del triángulo. Después, ubica el porcentaje de arcillas en el eje correspondiente. Finalmente, encuentra el vértice donde la línea horizontal de las arcillas y la transversal de las arenas se juntan. Este vértice está enmarcado por un polígono que indica la clase de textura que corresponde al suelo analizado. Por ejemplo, un

suelo con 10% de arenas, 30% de arcillas y 60% de limos tiene una textura Franco-arcillo-limosa.

2.2. Método de inferencia mediante el tacto

2.2.1. Principio

El método para estimar la clase de textura mediante la prueba al tacto que se describe aquí está basado en la metodología descrita por Siebe et al. (2006). Esta metodología consiste en el análisis de las características de granulometría, consistencia, brillantez, adhesividad y moldeado del suelo, mediante su manipulación con la mano, los dedos (i.e. presionando, palpando y comprimiendo) y la observación visual. En general, debido a sus diferencias en tamaño, área superficial y propiedades coloidales, las arenas, limos y arcillas presentan las siguientes características en la prueba al tacto:

- *Arenas*: los granos son claramente palpables, no deja material fino en la palma de la mano y no se puede modelar una forma plana o cilíndrica sin que el suelo se agriete y disperse (i.e. no es moldeable).
- *Limos*: consistencia harinosa, la superficie se siente áspera al palpar entre los dedos índice y pulgar, se agrieta al presionar y se pueden modelar figuras de tamaño grueso y medio pero no figuras finas (i.e. poco moldeable).
- *Arcillas*: deja material fino en la palma de la mano, la superficie es lisa y brillante al palpar entre los dedos índice y pulgar y se pueden modelar figuras finas con el suelo (i.e. moldeable).

2.2.2. Procedimiento

Coloca una muestra de suelo de aproximadamente 1 g en la palma de la mano; humedece ligeramente con unas gotas de agua sin saturar el suelo. Posteriormente, observa las características de moldeado, adhesividad, consistencia, brillantes y tamaño de partículas minerales del suelo, siguiendo la clave de texturas que se presenta en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Clave para inferir la textura del suelo mediante la evaluación de características de moldeado, consistencia y granulometría de los suelos

| No. | Característica | Seguir en | Tipo de textura | Abrev. |
|----------|--|-----------|-----------------|--------|
| 1 | Intenta formar con la muestra un rollo del grosor de un lápiz | | | |
| | a) moldeable (se puede realizar el rollo) | 4 | | |
| | b) no moldeable (no puede realizarse el rollo porque se cuarteo y rompe) | 2 | | |

| | | | | |
|----------|--|----------|------------------------|------------|
| 2 | Palpa la consistencia entre los dedos índice y pulgar | | | |
| | a) adhesiva, se adhiere ligeramente al dedo (se pega a una superficie) | | Franco arenoso | FA |
| | b) no adhesiva, no presenta clara adherencia ni es moldeable | 3 | | |
| 3 | Frota la muestra entre las palmas de las manos | | | |
| | a) consistencia muy harinosa, no se perciben granos de arena | | Limoso | L |
| | b) consistencia muy harinosa y se perciben granos de arena (<50% arena) | | Franco limoso | FL |
| | c) muy arenosa (50-85% arena), queda material fino en las líneas de la palma | | Areno francoso | AF |
| | d) muy arenosa (>85% arena), no queda material fino en las líneas de la palma | | Arenoso | A |
| 4 | Intenta formar un rollito del grosor de una aguja para tejer gruesa | | | |
| | a) moldeable, superficie opaca, consistencia harinosa | 5 | | |
| | b) moldeable, consistencia plástica (se pueden modelar diferentes formas con la masa y éstas se conservan de modo permanente), pegajosa (se pega fácil y permanentemente a la superficie de los dedos u otra superficie) | 6 | | |
| | c) no moldeable (no se puede hacer el rollito), se adhiere al dedo, se perciben granos de arena (<46% de arena) | | Franco arcillo arenoso | FYA |
| 5 | Evalúa la consistencia | | | |
| | a) adhesiva, harinosa, se agrieta fácilmente al presionar | | Franco limoso | FL |
| | b) ligeramente harinosa, casi no se agrieta, muy moldeable | | Franco arcillo limoso | FYL |
| | c) granos de arena visibles y perceptibles, se agrieta al presionar | | Franco | F |
| 6 | Evalúa la superficie de la muestra después de friccionarla con la uña del dedo | | | |
| | a) superficie opaca o con brillo tenue, casi no se perciben granos de arena | | Franco arcilloso | FY |
| | b) superficie opaca o ligeramente brillante, granos de arena perceptibles | | Arcillo arenoso | YA |
| | c) superficie brillante | 7 | | |
| 7 | Evalúa la consistencia entre los dedos | | | |

| | | | | |
|--|---------------------------------------|--|----------------|-----------|
| | a) rechina, hace un ruido al tallarse | | Arcillo limoso | YL |
| | b) consistencia de mantequilla | | Arcilloso | Y |

Fuente: modificado de Siebe et al., 2006. Abreviaturas tomadas de FAO, 2009.

III. Interpretación

La textura determina el tamaño de los poros y el volumen poroso total del suelo; conforme aumenta el tamaño de las partículas aumenta el tamaño de los poros, pero desciende el volumen poroso total (Tabla 1.2). Asimismo, las diferencias en tamaño de los poros influyen sobre el movimiento del agua y el aire en la matriz del suelo. Los poros grandes permiten un drenaje rápido del agua, mientras que los poros pequeños disminuyen la tasa de movimiento del agua, y tienden a retener agua en sus espacios capilares (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Porosidad, conductividad hidráulica y retención de agua en suelos en función de su clase de textura

| Clase de textura | Porosidad (%) | Conductividad hidráulica (cm/h) | CRAD (% en vol.) |
|------------------|---------------|---------------------------------|------------------|
| Arenoso | 38 (32-42) | 5 (2.5-25) | 8 (6-10) |
| Franco arenoso | 43 (40-47) | 2.5 (1.3-7.6) | 12 (9-15) |
| Franco | 47 (43-49) | 1.3 (0.8-2.0) | 17 (14-20) |
| Franco arcilloso | 49 (47-54) | 0.8 (0.25-1.5) | 19 (16-22) |
| Arcillo limoso | 51 (49-53) | 0.25 (0.03-0.5) | 21 (18-23) |
| Arcilloso | 53 (51-55) | 0.05 (0.01-1.0) | 23 (20-25) |

CRAD, capacidad de retención de agua disponible. Fuente: Flores y Alcalá, 2010.

Por otra parte, como las arcillas presentan una carga negativa y una mayor superficie específica, los suelos arcillosos tienen una mayor capacidad de retener cationes y proteger materia orgánica (e.g. compuestos humificados) en comparación con suelos limosos y arenosos (Tabla 1.3). No obstante, la capacidad de retención de cationes también depende del tipo de arcilla dominante y la cantidad de materia orgánica que tiene el suelo, ya que estos determinan la superficie específica y la carga neta del suelo (Brady y Weil, 2013). También, dada la carga neta de las arcillas y su capacidad de interactuar con cationes y materia orgánica, los suelos arcillosos tienden a tener una mayor formación de **agregados** estables y una estructura más consolidada.

Los capítulos 2, 8 y 9 del presente manual retoman el efecto de la textura sobre la formación de agregados, la protección de la materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico, respectivamente.

Tabla 1.3. Propiedades o comportamiento relativo de suelos con diferente textura

| Propiedad/ comportamiento | Clasificación del suelo | | |
|---|-------------------------|--------------|------------------------------------|
| | Arenoso | Limoso | Arcilloso |
| Retención de agua | Baja | Media a alta | Alta |
| Aireación | Buena | Media | Pobre |
| Tasa de drenaje | Alta | Lenta-media | Muy lenta |
| Concentración de materia orgánica | Baja | Media-alta | Alta-media |
| Descomposición de materia orgánica | Rápida | Media | Lenta |
| Calentamiento en primavera | Rápido | Moderado | Lento |
| Compresibilidad | Baja | Media | Alta |
| Susceptibilidad a erosión por aire | Moderada | Alta | Baja |
| Susceptibilidad a erosión por agua | Baja | Alta | Baja si está agregado, si no, alta |
| Contracción potencial | Muy baja | Baja | Moderada-alta |
| Sellado de estanques, presas y vertederos | Pobre | Pobre | Bueno |
| Facilidad para la labranza después de la lluvia | Buena | Media | Pobre |
| Potencial de lixiviación de contaminantes | Alta | Media | Baja (excepto cuando se agrieta) |
| Habilidad para almacenar nutrientes de plantas | Pobre | Media-alta | Alta |
| Resistencia al cambio de pH | Baja | Media | Alta |

Fuente: Brady y Weil, 2013.

IV. Autoevaluación

1. Define qué es la textura del suelo y explica cómo la afectan el tamaño de los poros y el volumen poroso total del suelo.
2. Menciona cuál es el proceso químico que determina la formación de las arcillas en los suelos y en qué consiste.
3. Menciona qué características distinguen a las arcillas de las arenas y los limos.
4. Explica en qué se basa el método del hidrómetro para determinar la textura de un suelo.
5. Para qué se usa el hexametáfosfato de sodio en el método para determinar la textura.

6. Completa el siguiente cuadro sobre textura.

| Arenas (%) | Limos (%) | Arcillas (%) | Textura |
|------------|-----------|--------------|---------|
| 80 | 15 | 5 | |
| | | | Franca |
| 20 | 20 | 60 | |
| 20 | 60 | 20 | |

7. De los suelos con diferente clase de textura que se presentan en la pregunta 6, ¿cuál tendrá mayor capacidad para retener agua y cuál tendrá mayor conductividad hidráulica, y por qué?

8. Completa la siguiente tabla, indicando la clase de textura que corresponde al suelo con base en las características que se presentan y su comparación con la Tabla 1.1.

| Características del suelo | Clase de textura |
|--|------------------|
| El suelo no es moldeable (no se forma un rollo del tamaño de lápiz delgado), tampoco es adhesivo (no se adhieren las partículas a las yemas de los dedos), tiene consistencia harinosa y se perciben granos de arena. | |
| Con el suelo se puede moldear un rollo del tamaño de un lápiz y también uno del tamaño de una aguja de tejer. Al tacto se siente pegajoso. Al friccionarse con la uña de los dedos se observa opaca o con brillo tenue y se perciben granos de arena al tacto. | |

Distribución de agregados estables

2

Carlos Antonio Anaya Merchant

En este capítulo se espera que el alumno comprenda el concepto de agregación del suelo, reconozca su importancia y aprenda un método físico para determinar la distribución de agregados del suelo.

I. Introducción

La **estructura del suelo** se refiere al arreglo tridimensional de las partículas y espacios vacíos del suelo; es decir, al tamaño, forma y disposición de sólidos y poros, y a la continuidad que tienen estos últimos (Bronick y Lal, 2005). La estructura es una propiedad muy importante debido a que regula el movimiento de agua, aire, nutrientes y organismos en la matriz del suelo (Osman, 2013).

Un indicador de la estructura del suelo es la distribución de agregados estables de diferentes tamaños (Bronick y Lal, 2005). Los agregados son la unidad básica de la estructura, y se definen como una asociación de partículas minerales con sustancias orgánicas e inorgánicas que tiene un mayor grado de cohesión interna entre sí, en comparación con la asociación con partículas externas que los rodean (Kemper y Rosenau, 1986). Los agregados se han clasificado por su tamaño en macroagregados ($>250 \mu\text{m}$ diámetro) y microagregados ($<250 \mu\text{m}$ diámetro), aunque estos grupos pueden subdividirse aún más (Tisdall y Oades, 1982). La formación de los agregados (i.e. agregación) y su recambio resultan de la interacción de diversos factores, incluyendo: la composición mineral del suelo, la proporción de arcillas, la concentración de materia orgánica, la actividad de los organismos del suelo, la densidad de raíces, el ambiente (e.g. agua y temperatura) y la labranza. La agregación del suelo es promovida por diversos **agentes cementantes** o aglutinantes, los cuales pueden ser minerales, como **cationes polivalentes**, u orgánicos como polisacáridos, hifas y raíces (Figura 2.1). Tisdall y Oades (1982) clasificaron a los agentes aglutinantes orgánicos en: a) transitorios (e.g. polisacáridos), b) temporales (e.g. raíces e hifas fúngicas) y c) persistentes (e.g. compuestos orgánicos resistentes asociados con cationes polivalentes fuertemente adsorbidos). Según dichos autores, la estabilidad de los microagregados depende principalmente de los agentes cementantes inorgánicos (p.ej. cationes polivalentes) y orgánicos persistentes (e.g. humus), mientras que la estabilidad de los macroagregados depende en mayor medida de las hifas y las raíces, aunque en suelos ricos en cationes polivalentes, como los calcáreos, los cationes también pueden jugar un papel impor-

tante en estabilizar a los macroagregados (Oades y Waters, 1991). Se ha sugerido que los agregados que son estabilizados por agentes orgánicos presentan una estructura jerárquica anidada, donde los macroagregados están conformados por microagregados (Figura 2.1), y que los microagregados se forman al interior de los macroagregados mediante la **descomposición** de la materia orgánica que ocurre dentro de estos últimos (Tisdall y Oades, 1982; Six et al., 2004).

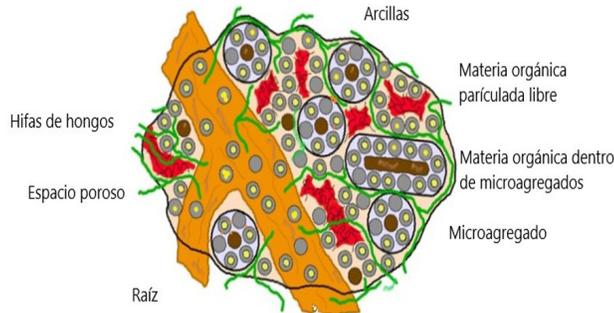


Figura 2.1. Modelo conceptual de un agregado. Nota que dadas las diferencias en tamaños de poros que están afuera y adentro de los agregados, la materia orgánica dentro de los microagregados está más protegida físicamente de la descomposición microbiana que la que está adentro de los macroagregados y afuera estos.

Los diferentes tamaños de agregados influyen de manera particular sobre la dinámica del agua, aire y microorganismos (Six et al., 2004). Por una parte, el tamaño de los poros desciende conforme disminuye el tamaño de los agregados, por lo que suelos con abundancia de agregados estables grandes pueden tener mejor drenaje e intercambio de gases que aquellos donde dominan los agregados pequeños. Por otro lado, los microorganismos del suelo viven en el espacio poroso y por lo tanto su dinámica y los procesos mediados por ellos dependen de la red de poros y del tamaño de estos, así como del tamaño de los agregados (Six et al., 2004). Por ejemplo, en los microagregados, la retención de agua en los microporos puede reducir la tasa de difusión de oxígeno y producir condiciones anóxicas en el interior de estos, lo cual favorece que en estos microambientes dominen procesos reductores (e.g. denitrificación) sobre procesos oxidantes (e.g. **respiración**) (Phillipot et al., 1997).

Los métodos para aislar a los agregados se basan en procedimientos físicos, mediante tamizados de suelo en seco o con humedecimiento. Aquí se presenta un procedimiento para separar diferentes tamaños de agregados estables en agua a partir de un tamizado en húmedo, siguiendo la metodología propuesta por Elliot et al. (1999).

Las hifas de los hongos micorrízicos producen una glicoproteína llamada glomalina, la cual es muy resistente a la descomposición y actúa como agente cementante o de unión en la agregación de las partículas del suelo.

Debido a que en sus superficies tienen más de una carga, los cationes polivalentes y los compuestos orgánicos pueden funcionar como puentes de unión entre dos o más minerales de arcilla.

II. Método

2.1. Principio

El método Elliot et al. (1999) consiste en la separación física de los agregados de diferentes tamaños a través del tamizado del suelo por un conjunto de tamices con tamaños de malla: 8000 μm , 2000 μm , 250 μm y 56 μm . Este tamizado permite el fraccionamiento de cuatro tamaños de agregados: macroagregados grandes (8000-2000 μm), macroagregados pequeños (2000-250 μm), microagregados (250-56 μm) y una fracción organomineral menor a 56 μm que incluye limos, arcillas y agregados muy pequeños. El suelo es humedecido previo al tamizado con el fin de separar solamente los agregados que son estables al humedecimiento, es decir, aquellos que no se rompen al humedecerse. Por la misma sensibilidad de los agregados al humedecimiento, es importante seguir el procedimiento de humectación de manera cuidadosa y respetar los tiempos de tamizado para obtener resultados consistentes. Los pesos de cada una de las fracciones se deben corregir por el contenido de arenas presente en cada una de ellas, de tal forma que los resultados se presentan en términos del peso de los agregados libres de arenas.

Durante el humedecimiento el agua desplaza el aire del interior de los poros y ejerce presión sobre las superficies, generando que las uniones débiles entre sólidos se rompan y los agregados inestables se disgreguen.

Se debe corregir el peso de las distintas fracciones por el contenido de arenas para evitar que las arenas sean contabilizadas como agregados.

2.2. Materiales y equipos

| Materiales |
|--|
| Contenedores de plástico o aluminio con un diámetro y altura ligeramente mayor al de los tamices |
| Charolas de aluminio pequeñas para secar en horno |
| Vasos de plástico de boca ancha con tapa de 150 ml |
| Piseta con agua |
| Espátula de plástico |
| Equipos |
| Juego de tamices con diámetros de malla de: 8 mm (8000 μm), 2 mm (2000 μm) (No. 10), 250 μm (No. 60) y 53 μm (No. 270) |
| Balanza |
| Horno de secado |

2.2.1. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|--|---|
| Agua destilada | N. A. |
| Hexametáfosfato de sodio (Na ₃ PO ₃) al 5% p/v. | Disolver 50 g de Na ₃ PO ₃ en agua destilada y aforar a 1 L |

N. A. = no aplica.

2.3. Procedimiento

- a) *Preparación de las muestras.* Tamiza el suelo fresco colectado en campo por un tamiz con abertura de malla de 8 mm, y deja secar a la sombra por 24 h. Pesa tres submuestras en charolas de aluminio, una de 100 g para determinar la distribución de tamaño de agregados, otra de 30 g para establecer el contenido de arenas grandes y finas, y otra de 20 g para determinar la humedad del suelo.
- b) *Tamizado en húmedo.* En un contenedor con dimensiones superiores a las del tamiz, pon agua limpia hasta una altura tal que la malla de los tamices se pueda hundir en ella a una profundidad de 4 cm. Coloca el tamiz de 2 mm por encima del contenedor sin tener contacto con el agua y pon en su interior los 100 g del suelo fresco. Baja el tamiz de tal forma que el suelo quede sumergido dentro del agua, y deja reposar por 5 min para que los agregados inestables se rompan. Posteriormente, mueve el tamiz verticalmente arriba y abajo 3 cm a un ritmo de 25 veces por minuto durante 2 min. Cuando muevas el tamiz hacia arriba, los agregados que contiene deben quedar ligeramente por encima del nivel del agua; por su parte, el movimiento descendente debe hundir a los agregados por completo. Transfiere el material remanente sobre la malla a una charola de aluminio y secar en horno a 105 °C hasta peso constante. En este procedimiento se obtiene la fracción de 8000-2000 μm . Coloca el tamiz de 250 μm sobre un contenedor y vacía dentro de él todo el material de suelo que atravesó por el tamiz de 2 mm. Para colectar todo el material del contenedor puedes adicionar un poco de agua con una piseta para remover los residuos de suelo que puedan quedar en el fondo de éste. Una vez depositado todo el suelo dentro del tamiz, procede a tamizar en húmedo al mismo ritmo: 25 veces por minuto durante 2 min. Pasa el material retenido en la malla del tamiz a una charola de aluminio y sécalo en el horno. Obtendrás la fracción 2000-250 μm . Deposita la fracción de suelo que atravesó por el tamiz de 250 y déjalo dentro del tamiz de 53 μm , previamente colocado en una charola, y tamiza al mismo ritmo que los tamizados previos. El material capturado por este tamiz corresponde a la fracción de 250-53 μm . Desecha el material que pasó a través de la malla de 53 μm en algún jardín. El peso seco de la fracción <53 μm se determina por diferencia de peso, restando al peso inicial del suelo los pesos secos de los tres tamaños de agregados, como se explica más adelante.
- c) *Determinación de los porcentajes de arenas finas y gruesas.* Coloca 30 g de suelo cribado por el tamiz de 8 mm en un vaso de plástico de 150 ml con tapa. Agrega 100 ml de hexametáfosfato de sodio al 5% y agita por 1 h en un agitador recíproco para dispersar el suelo. Tamiza la suspensión por un tren de tamices de 2 mm, 250 μm y 53 μm . Colecta todas las fracciones que quedaron atrapadas por lo tamices en charolas de aluminio (previamente pesadas), y seca en horno a 105 °C hasta el peso constante. Los pesos de estas frac-

ciones de arenas se usarán para corregir los pesos de los diferentes tamaños de los agregados.

- d) *Determinación de la humedad del suelo.* Coloca 20 g de suelo cribado por el tamiz de 8 mm en una charola de aluminio previamente pesada, y seca al horno a 105 °C hasta peso constante. Posteriormente determina el peso seco del suelo (véase la metodología para determinar humedad del suelo en el capítulo 4 del presente manual).

III. Cálculos

Para determinar la distribución de agregados debes calcular el porcentaje en peso que representa cada tamaño de ellos del total de la muestra de suelo. Para eliminar el efecto de la textura sobre la distribución de agregados se debe hacer una corrección por la concentración de arenas del suelo (Soil Survey Staff, 2014). Para ello se usa la siguiente ecuación (2.1):

$$Ag_i = \left(\frac{PAg_i - PS_i}{\frac{PT}{\left(\frac{AD}{OD}\right)} - PS_{total}} \right) * 100$$

Donde:

- Ag_i = porcentaje del agregado de la clase de tamaño i (%)
- PAg_i = peso seco de los agregados de la clase de tamaño i (g)
- PS_i = peso seco de las arenas de tamaño i (g)
- PT = peso fresco total del suelo inicial (g)
- AD/OD = peso del suelo fresco / peso del suelo secado en horno (g)
- PS_{total} = peso seco total de la sumatoria de arenas de diferentes tamaños (g).

Una vez determinado el porcentaje que representa cada tamaño de agregado del peso total del suelo, se calcula por diferencia la proporción de la fracción mineral (limos + arcillas) con la siguiente ecuación (2.2):

$$FM = 100 - Mag - Map - Mi$$

Donde:

- FM = fracción mineral de limos y arcillas (%)
- Mag = macroagregados grandes (%)
- Map = macroagregados pequeños (%)
- Mi = microagregados (%)

Como un indicador del tamaño promedio de los agregados se puede calcular el diámetro medio de los agregados (DMA), el cual es igual a la suma de los productos del diámetro medio de cada clase de agregado

por la fracción que representa cada clase de agregado respecto del total (De Gryze et al., 2004), como se muestra en la siguiente ecuación (2.3):

$$DMA = ((8000+2000)/2) \cdot (A/100) + ((2000+250)/2) \cdot (B/100) + ((250+53)/2) \cdot (C/100) + (53/2) \cdot (D/100)$$

Donde:

DMA= diámetro medio de los agregados (μm)

A, B, C y D corresponden a los porcentajes de peso que representan los macroagregados grandes, macroagregados pequeños, microagregados y la fracción mineral con respecto al peso total del suelo, respectivamente.

IV. Interpretación

La distribución de agregados estables es afectada por diversos factores, incluyendo los componentes del suelo (e.g. textura, tipo de arcillas, concentración de materia orgánica y concentración de cationes polivalentes), la densidad de raíces, la abundancia de hifas de hongos y el manejo del suelo, por lo que su interpretación puede ser contexto dependiente (Osman, 2013). No obstante, dentro de un tipo de suelo, se asume de manera general que entre mayor sea la proporción de macroagregados o más alto sea el diámetro medio de los agregados, la estabilidad de los agregados es mayor (Nimmo y Perkins, 2002; Hazelton y Murphy, 2007) (Tabla 2.1) y el suelo tiene una mejor estructura y porosidad (Nimmo y Perkins, 2002; Bronick y Lal, 2005). Cuando los macroagregados presentan baja estabilidad al humedecerse (i.e. se disgregan con la humedad), los poros se tapan, el suelo se compacta y la **permeabilidad** se reduce (Bronick y Lal, 2005).

Tabla 2.1. Clasificación de la estabilidad de los macroagregados grandes a partir de un tamizado húmedo

| Agregados estables de 1-2 mm (%) | Clasificación |
|----------------------------------|---------------|
| <10 | Muy baja |
| 10-20 | Baja |
| 20-30 | Moderada |
| >30 | Alta |

Fuente: Hazelton y Murphy, 2007.

La proporción de agregados estables en agua se ha relacionado con la **erodabilidad** de un suelo, es decir con la susceptibilidad del suelo a sufrir erosión; esta relación es inversamente proporcional: entre mayor proporción de macroagregados estables, menor susceptibilidad a la erosión (Egashira et al., 1983; Bronick y Lal, 2005).

Como la materia orgánica promueve la agregación de los suelos, y ésta se encuentra protegida físicamente dentro de los agregados, se

puede esperar que la concentración de materia orgánica y el tiempo de residencia de esta aumenten proporcionalmente con la agregación; lo que redundaría en un mayor secuestro de carbono en el suelo (Six et al., 2004; De Gryze et al., 2004). Por ejemplo, la labranza de los suelos agrícolas generalmente reduce la proporción de macroagregados y en consecuencia disminuye la concentración de materia orgánica debido a que ésta queda menos protegida físicamente y, por lo tanto, más expuesta al ataque por microorganismos descomponedores (Six et al., 2004).

V. Autoevaluación

1. Explica en qué consiste la agregación del suelo.
2. ¿Cuáles pueden ser los componentes de un macroagregado del suelo?
3. ¿Cómo puede variar el tamaño de los poros entre macro y microagregados?
4. ¿Por qué la materia orgánica que está dentro de los microagregados está más protegida de la descomposición microbiana que la que está en los macroagregados y fuera de estos?
5. Con los datos que se presentan en la siguiente tabla calcula:
 - a) el porcentaje de cada tamaño de agregados libre de arenas del suelo
 - b) el porcentaje de la fracción mineral, y
 - c) el diámetro medio de los agregados (DMA).

En la tabla se muestran los datos de peso seco (en gramos) de cada tamaño de agregado y de sus arenas (en paréntesis). Para los cálculos considera que se usaron 100 g de suelo fresco y el cociente peso fresco / peso seco del suelo es de 1.05.

| Macroagregados grandes | | Macroagregados pequeños | | Microagregados | | Fracción mineral | DMA (μm) |
|------------------------|---|-------------------------|---|----------------|---|------------------|-----------------------|
| g | % | g | % | g | % | % | |
| 15 (7) | | 33 (10) | | 35 (10) | | | |
| 3 (1) | | 25 (10) | | 45 (20) | | | |
| 0 (0) | | 10 (7) | | 80 (55) | | | |

Densidad aparente

Carlos Antonio Anaya Merchant

3

En este capítulo se espera que el alumno comprenda el concepto de densidad aparente del suelo, reconozca los factores que influyen sobre ella y aprenda un par de métodos para medirla.

I. Introducción

La densidad aparente del suelo se define como la relación de la masa de suelo seco por unidad de volumen, y se expresa normalmente en g/cm^3 o en mg/m^3 . La densidad aparente se distingue de la densidad real o densidad de las partículas del suelo en que la primera toma en cuenta el volumen que ocupan los sólidos y los poros del suelo, mientras que la segunda sólo considera el volumen que ocupa la fase sólida, sin el espacio poroso (Soil Survey Staff, 2014).

La densidad aparente se determina con mucha frecuencia en estudios ecológicos de suelos debido a que es una variable crítica para estimar los almacenes de materia orgánica, agua y nutrientes en el suelo, y por lo tanto para realizar balances de masas en los **ecosistemas** (Batjes, 2014); también, porque esta propiedad está directamente relacionada con la porosidad del suelo e influye de manera importante sobre el movimiento de agua y aire, la actividad de los organismos y la labranza del suelo (Binkley y Fisher, 2013). Por ejemplo, la densidad aparente normalmente se correlaciona positivamente con la compactación y con la resistencia a la penetración, y negativamente con el volumen poroso, la aireación y la tasa de infiltración de los suelos (Elliott et al., 1999). Entre los factores que afectan a la densidad aparente se incluyen la concentración de materia orgánica, la textura del suelo y la acción de diferentes procesos que afectan la estructura del suelo y su porosidad (Osman, 2013). La concentración de materia orgánica afecta de manera directa a la densidad debido a que su masa específica (g/cm^3) es menor que la de los minerales del suelo, y de manera indirecta por el hecho de que la materia orgánica promueve la formación de agregados del suelo (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, los histosoles, que tienen una concentración de materia orgánica muy alta, son los suelos con menor densidad aparente (Tabla 3.1). La textura influye sobre la densidad aparente a través de su efecto sobre la densidad real, el tamaño de los poros y el volumen poroso total de los suelos (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, los suelos de textura fina (e.g. arcillosa y franco arcillosa) suelen tener una densidad más baja que los suelos arenosos (Tabla 3.2), debido a que los primeros tienen una mayor porosidad y tienden a estabilizar o retener más materia orgánica (Brady y Weil, 2013).

El término almacén se usa como sinónimo de contenido por lo que se expresa en unidades de masa por unidad de área (kg/m^2) o en unidades de masa por unidad de volumen (kg/m^3).

Entre los procesos naturales que determinan la densidad aparente se encuentran la agregación del suelo, el crecimiento de raíces e hifas de hongos, las excavaciones de la fauna y la compactación (Brady y Weil, 2013). Por efecto de estos procesos es posible encontrar suelos con textura similar, pero con diferente estructura y densidad aparente. Existen diferentes metodologías para determinar la densidad aparente, pero todas ellas se basan en el análisis de dos parámetros del suelo: la masa y el volumen (ver Soil Survey Staff, 2014), aquí se explican los métodos del núcleo o cilindro de suelo y el método de excavación.

En ecosistemas naturales, la densidad aparente normalmente varía dentro del intervalo de 0.3 g/cm^3 en suelos ricos en materia orgánica y 1.9 g/cm^3 en suelos arenosos, pero en suelos manejados con alta compactación puede llegar a ser mayor a 2 g/cm^3 .

II. Método

2.1. Principio

Los métodos para determinar la densidad aparente que se describen aquí son gravimétricos. Éstos consisten en recolectar una muestra de suelo de un volumen con dimensiones conocidas, secar el suelo en horno hasta el peso constante y determinar su peso seco con una balanza (Smith y Mullins, 2000). Para la colecta de suelo en campo, en el método del núcleo de suelo se usa un nucleador de suelos o un tubo cilíndrico con un volumen interno conocido (Soil Survey Staff, 2014), mientras que en el método de la excavación se extrae un volumen de suelo mediante la realización de un hoyo pequeño (con dimensiones medibles) con el uso de una pala de jardinero (Smith y Mullins, 2000). El primero es apropiado para suelos que no son pedregosos, ni muy sueltos o arenosos en los que se puede introducir un cilindro de acero al suelo y extraer una muestra de este sin tener pérdidas; también es más fácil de aplicar en perfiles de suelo que requieren datos de densidad por horizonte. El segundo es aplicable en la mayoría de los suelos (Smith y Mullins, 2000), pero generalmente se usa para la capa superficial.

Los métodos gravimétricos se basan en la medición de la cantidad de una sustancia a través de la determinación de su peso con el uso de una balanza.

Un nucleador o barrena de cilindro para colecta de suelos consiste en un tubo de acero con la boca inferior semiafilada y un cilindro interno extraíble (Fig. 3.1).

2.2. Materiales y equipos para campo y laboratorio

| Materiales | |
|-------------|---|
| Campo | Bolsas de plástico de 2 kg |
| Campo | Espátula o cuchillo |
| Campo | Rollo de plástico autoadherente para envolver (opcional) |
| Campo | Cinta métrica de costurero |
| Campo | 2 L de agua o 2 kg de arena fina |
| Campo | Pala de jardinero pequeña |
| Campo | Lápiz, libreta, plumón indeleble y etiquetas |
| Laboratorio | Charolas de aluminio de aproximadamente 10 cm para secar al horno (una por muestra) |

| | |
|-------------|--|
| Laboratorio | Probeta graduada |
| Laboratorio | Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Equipos | |
| Campo | Nucleador para extraer muestras sin perturbar o cilindros de acero inoxidable o PVC de 2" de diámetro y de 2 a 4" de largo |
| Laboratorio | Balanza digital |
| Laboratorio | Horno eléctrico para secar |

2.3. Procedimiento

Método del núcleo de suelo

- a) *Preparación del lugar de colecta.* Selecciona el sitio donde se realizará la colecta del suelo, y remueve la capa de mantillo para dejar el suelo expuesto.
- b) *Colecta de muestra.* Introduce el nucleador en el suelo de manera vertical hasta la profundidad deseada. Extrae el nucleador del suelo y remueve de su interior el cilindro con la muestra de suelo (Figura 3.1). Retira cuidadosamente el suelo excedente con el uso de una espátula o cuchillo e introdúcelo en una bolsa previamente etiquetada para transportarlo al laboratorio. Si requieres volver a usar el cilindro para coleccionar otra muestra, extrae todo el suelo del interior del cilindro y colócalo dentro de una bolsa etiquetada. Alternativamente, si no se cuenta con nucleador, introduce al suelo un cilindro o anillo de acero mediante su golpeteo con un martillo, teniendo cuidado de colocar un madero por encima de la boca del cilindro a golpear para distribuir la fuerza del golpe de manera más homogénea sobre el cilindro y evita daños al mismo. Extrae el cilindro del suelo con ayuda de la pala de jardinero, teniendo cuidado de que no haya pérdidas de material del interior del cilindro.

Cuando se analiza la densidad en un perfil de suelo se deben de tomar muestras de cada horizonte del perfil. En estos casos es más práctico usar un cilindro de acero para extraer la muestra que un nucleador.

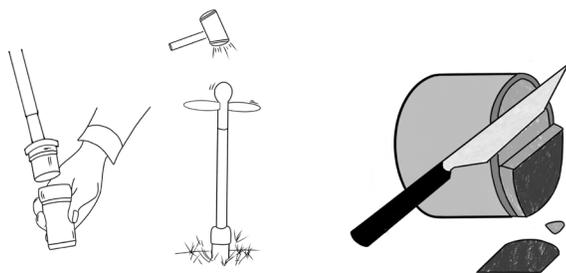


Figura 3.1. Colecta de suelo para determinar la densidad aparente. Se introduce el nucleador al suelo con golpeteo, se extrae el nucleador del suelo, se retira el cilindro interno que contiene el suelo y se eliminan los excesos de suelo del exterior del cilindro.

- c) *Secado del suelo.* En el laboratorio, extrae todo el suelo del interior del cilindro o de la bolsa y colócalo en una charola de aluminio previamente pesada. Seca la muestra de suelo a 105 °C por más de

24 h, hasta el peso constante. Antes de cada pesada, debes dejar reposar el suelo seco dentro de un desecador por 15 min, para que no absorba humedad del ambiente. Finalmente, determina el peso seco del suelo restando el peso de la charola.

- d) *Determinar el volumen interno del cilindro.* Para ello hay que medir la altura (A) y el diámetro interno del núcleo (D), y emplear la fórmula del cilindro ($Vol = (3.1416 \times D \times A) / 4$).

Método de excavación

- a) *Preparación del lugar de colecta.* Selecciona el sitio donde se realizará la colecta del suelo, y remueve la capa de mantillo para dejar el suelo expuesto.
- b) *Colecta de suelo.* Cava un hoyo en el suelo de aproximadamente 10 cm x 10 cm x 10 cm, teniendo la precaución de guardar todo el suelo extraído del hoyo en una bolsa de plástico, sin pérdidas, para determinar su masa seca (Figura 3.2).
- c) *Determinar el volumen del hoyo con ayuda de arena o agua.* Para esto, primero hay que determinar el volumen de una muestra de arena o agua que exceda el volumen que tiene el hoyo. En caso de usar arena, vaciar ésta dentro del hoyo hasta cubrirlo totalmente de manera rasante. Una vez realizado esto, determina el volumen de arena sobrante y estima el volumen de arena introducido en el hoyo por diferencia. Si usas agua, debes realizar el mismo procedimiento, pero en este caso debes introducir una bolsa de plástico delgada dentro del hoyo de manera que se cubran todas sus paredes para evitar la infiltración de agua en el suelo cuando se vierta ésta en su interior.
- d) *Secado de la muestra.* Coloca la muestra de suelo en una charola de aluminio previamente pesada, seca la muestra del suelo en horno a 105 °C hasta el peso constante por más de 24 h. Determina el peso seco del suelo restando el peso de la charola.

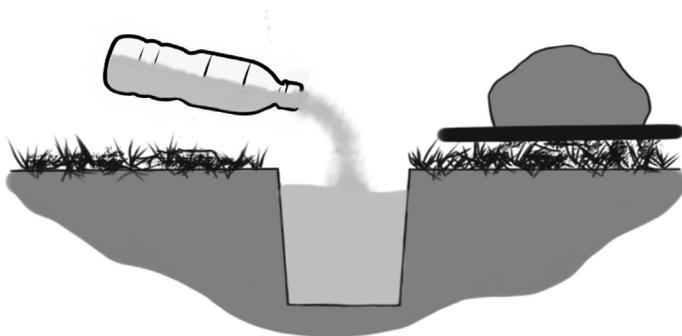


Figura 3.2. Determinación de la densidad aparente por excavación. Se extrae una masa de suelo evitando pérdidas de material. Se mide el volumen del hoyo con un volumen conocido de agua o arena. Se seca el suelo y se determina la relación masa:volumen.

III. Cálculos

Para calcular la densidad aparente se usa la siguiente ecuación (3.1):

$$DA = \frac{Ms}{V}$$

Donde:

DA = densidad aparente (g/cm³)

Ms = masa seca de suelo (g)

V = volumen del suelo (cm³)

IV. Interpretación

La densidad aparente es afectada por la composición mineralógica, la textura y la concentración de materia orgánica de los suelos (White, 2006), por lo que las diferentes clases de suelos presentan intervalos normales dentro de los cuales suele variar su densidad aparente (Tablas 3.1. y 3.2).

La densidad aparente se determina sobre la fracción fina del suelo (<2 mm), por lo que se deben hacer correcciones de masa y volumen por el contenido de partículas mayores a 2 mm. Para ello, posterior al secado de la muestra, se criba ésta por un tamiz de 2 mm, se determina el peso y volumen de la fracción retenida por el tamiz, los valores obtenidos se restan a los datos originales, y con los datos resultantes se calcula la DA.

Tabla 3.1. Valores mínimos, máximos y promedio de densidad aparente del suelo (mg/m³) de diferentes unidades de suelo

| Unidad de suelo | N | Mín. | Máy. | Prom. | CV |
|-----------------|------|------|------|-------|------|
| Acrisol | 990 | 0.54 | 1.98 | 1.41 | 15 |
| Cambisol | 1219 | 0.53 | 2.47 | 1.36 | 20 |
| Chernozem | 120 | 1.07 | 2.34 | 1.45 | 17 |
| Rendzina | 34 | 0.53 | 1.94 | 1.34 | 28 |
| Ferralsol | 724 | 0.69 | 2 | 1.26 | 18 |
| Gleysol | 486 | 0.54 | 2.17 | 1.38 | 24 |
| Phaeozem | 500 | 0.8 | 2.31 | 1.46 | 16 |
| Litosol | 1 | 1.42 | 1.42 | 1.42 | s.d. |
| Fluvisol | 1030 | 0.55 | 2.02 | 1.4 | 17 |
| Kastanozem | 48 | 1.02 | 2.25 | 1.55 | 21 |
| Luvisol | 1030 | 0.6 | 2.45 | 1.54 | 14 |
| Greyzem | 5 | 1.34 | 1.58 | 1.5 | 6 |
| Nitosol | 219 | 0.58 | 1.85 | 1.43 | 17 |
| Histosol | 106 | 0.03 | 0.94 | 0.31 | 80 |
| Podzol | 201 | 0.52 | 2.16 | 1.32 | 24 |
| Arenosol | 103 | 1.22 | 1.9 | 1.61 | 8 |
| Regosol | 167 | 0.91 | 2.13 | 1.51 | 14 |
| Solonetz | 173 | 0.95 | 2.01 | 1.64 | 12 |
| Andosol | 353 | 0.28 | 0.99 | 0.73 | 22 |
| Ranker | 2 | 1.26 | 1.7 | 1.48 | 15 |

| | | | | | |
|-----------|-----|------|------|------|----|
| Vertisol | 636 | 0.9 | 2.51 | 1.67 | 16 |
| Planosol | 67 | 0.6 | 2 | 1.57 | 16 |
| Xerosol | 253 | 0.9 | 2.02 | 1.49 | 12 |
| Yermosol | 175 | 0.51 | 2.27 | 1.51 | 14 |
| Solonchak | 150 | 0.63 | 2.01 | 1.48 | 19 |

N, número de datos; CV, coeficiente de variación (%); s.d., sin dato. Fuente: Modificado de Batjes, 2014.

Tabla 3.2. Valores de densidad aparente característicos de suelos con diferente clase de textura

| Densidad (g/cm ³) | Suelos arenosos | Suelos francos | Suelos arcillosos |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------------|
| <1.0 | - | Satisfactorio | Satisfactorio |
| 1.1-1.2 | - | Satisfactorio | Satisfactorio |
| 1.2-1.4 | Muy abierto | Satisfactorio | Poco compacto |
| 1.4-1.6 | Satisfactorio | Compacto | Compacto |
| 1.6-1.8 | Compacto | Muy compacto | Muy compacto |
| >1.8 | Muy compacto | Extremadamente compacto | Excesivamente compacto |

Fuente: Hazelton y Murphy, 2007.

La compactación disminuye la porosidad, por lo que puede ser detectada a través de un aumento en la densidad aparente. Conforme aumenta la compactación, la densidad aparente es mayor, y la penetración de las raíces a la matriz del suelo puede verse restringida, afectando la adquisición de agua y nutrientes por las plantas. En la Tabla 3.3 se presentan valores críticos de densidad aparente para suelos con diferente textura por encima de los cuales se puede restringir la penetración de las raíces en el suelo.

Tabla 3.3. Valores críticos de densidad aparente en los que la penetración de las raíces al suelo puede ser fuertemente restringida

| Textura | Densidad aparente crítica (g/cm ³) |
|---------------------------|--|
| Franco arenoso | 1.8 |
| Franco arenoso fino | 1.7 |
| Franco y franco arcilloso | 1.6 |
| Arcilloso | 1.4 |

Fuente: Hazelton y Murphy, 2007

V. Autoevaluación

1. ¿Cuál es la diferencia entre la densidad aparente y la densidad real de un suelo?
2. ¿Cómo puede afectar la materia orgánica a la densidad aparente?

DENSIDAD APARENTE

3. Menciona tres procesos naturales o antrópicos que pueden afectar la densidad del suelo.
4. ¿Cómo es la relación entre la densidad aparente y la cantidad de humedad que puede tener un suelo?
5. ¿Qué efecto puede tener el ganado sobre la densidad aparente del suelo en un potrero, y qué consecuencias podría tener ello sobre la tasa de infiltración de agua al suelo?
6. Completa la siguiente tabla calculando la densidad aparente. Nota que para calcular la densidad aparente debes de corregir los valores del peso y volumen del suelo (PS y VS, respectivamente) por la masa y volumen de gravas (PG y VG, respectivamente) que contiene éste.

| PS (g) | VS (cm ³) | PG (g) | VG (cm ³) | Densidad aparente |
|--------|-----------------------|--------|-----------------------|-------------------|
| 106 | 103.7 | 3 | 2.3 | |
| 90 | 78.5 | 1 | 1.3 | |
| 85 | 95 | 1.8 | 1.5 | |

Humedad

Carlos Antonio Anaya Merchant

4

En este capítulo se espera que el estudiante aprenda a determinar la humedad del suelo fresco y la humedad a capacidad de campo por el método gravimétrico, así como a expresar la humedad en unidades de masa y volumen.

I. Introducción

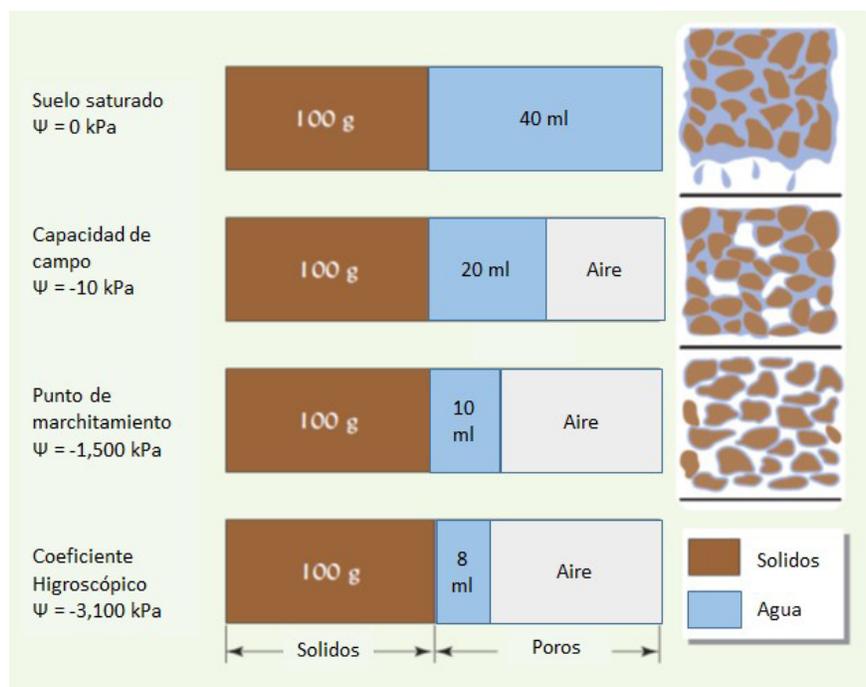
El suelo tiene un papel determinante en el ciclo hidrológico de los ecosistemas terrestres ya que funciona como un almacén de agua y modula las salidas de ésta por **evapotranspiración** y **escorrentía** (Osman, 2013). El agua es retenida en el espacio poroso del suelo gracias a las fuerzas de cohesión y adhesión de la molécula de agua. La cantidad de agua retenida en el suelo, también denominada humedad del suelo, puede ser medida en términos de masa o volumen. En este sentido, la humedad específica (o gravimétrica) se define como la masa de agua por unidad de masa de suelo seco (kg agua / kg suelo seco); la humedad volumétrica como el volumen de agua por unidad de volumen de suelo (cm^3 agua/ cm^3 de suelo); y la humedad absoluta como la masa de agua por unidad de volumen (kg agua/ m^3 suelo) (Osman, 2013).

Con fines comparativos y de análisis de la dinámica y disponibilidad de agua en el suelo, se han conceptualizado diferentes formas y condiciones de agua en el suelo, entre las que destacan: **suelo saturado**, **agua gravitacional**, **capacidad de campo**, **punto de marchitamiento**, **agua disponible** y **agua higroscópica** (Brady y Weil, 2013). El suelo saturado es aquel que tiene todo su espacio poroso lleno de agua (Figura 4.1). El agua gravitacional es aquella que percola a través de la matriz del suelo por efecto de la gravedad. La capacidad de campo se define como la cantidad de agua que retiene la matriz de un suelo una vez que el agua gravitacional ha drenado (Brady y Weil, 2013). Se ha estimado que un suelo a capacidad de campo tiene un potencial hídrico de aproximadamente -10 kPa (kilo-pascales), aunque este potencial hídrico puede variar dependiendo de la textura del suelo (Osman, 2013). Conforme el suelo se va secando por evapotranspiración, llega un momento en que el agua residual ya no puede ser tomada por las plantas, debido a que ésta es retenida a una fuerte tensión por las partículas sólidas y los poros capilares del suelo. A esta agua que no está disponible para las plantas se le conoce como agua de marchitamiento o punto de marchitamiento permanente. Se ha visto que la mayoría de las plantas tienen problemas para absorber agua cuando el suelo tiene un **potencial hídrico** de -1,500 kPa, por lo que por convención se usa este límite para determinar el punto de marchitamiento. Sin embargo, algunas especies

La cohesión del agua es la atracción que hay entre moléculas de agua como resultado de su polaridad, y la adhesión es la atracción que hay entre la molécula de agua y otras sustancias.

El potencial hídrico es una medida comparativa de la diferencia del estado de energía libre del agua en el suelo y el del agua pura en un estado de referencia, y se mide en unidades de presión. Se usa para predecir el movimiento del agua, el cual se da por diferencias de potencial de mayor a menor nivel de energía. Por convención el potencial hídrico del agua pura es de 0 kPa, y en suelos no saturados el potencial hídrico adquiere valores negativos debido a la cohesión y adhesión del agua a los sólidos del suelo.

de plantas, como las cactáceas, pueden absorber agua en suelos con potenciales hídricos más negativos (Brady y Weil, 2013). El agua disponible es aquella que puede ser tomada por las plantas, y se encuentra retenida en el suelo a una tensión menor que la del punto de marchitamiento. Así, el agua disponible se estima como la diferencia entre la humedad a capacidad de campo menos la humedad en el punto de marchitamiento (Brady y Weil, 2013). Finalmente, se reconoce que hay una fracción de agua que se encuentra adherida a las partículas sólidas del suelo, y que se encuentra en equilibrio con la humedad atmosférica relativa cercana a la saturación (98%). A esta agua se le conoce como agua higroscópica.



Empíricamente se ha determinado que un suelo saturado reduce su humedad hasta capacidad de campo después de aproximadamente 48 a 72 h de libre drenaje, aunque este tiempo depende de la textura y porosidad del suelo.

Figura 4.1. Condiciones de humedad en el suelo. Se presentan los volúmenes de agua y aire asociados a 100 g de suelo de un suelo bien-granulado franco limoso y los potenciales hídricos (Ψ) de cada condición (modificado de Brady y Weil, 2013).

La humedad depende del balance entre los flujos de entrada de agua al suelo y los flujos de salida de éste. La principal entrada generalmente está constituida por la precipitación pluvial y nieve, aunque puede haber otras, como la entrada de agua por condensación, el riego y la escorrentía de partes más altas del relieve; mientras que las principales vías de salida son la evapotranspiración, la escorrentía subsuperficial y la percolación hasta el manto acuífero. Estas salidas son determinadas por la pendiente del terreno, la cobertura vegetal, la temperatura del aire, la radiación y las propiedades físicas del suelo de textura y densidad aparente, entre otras (White, 2006).

La humedad del suelo juega un papel determinante en el funcionamiento de los ecosistemas, ya que influye sobre la tasa del intemperismo químico del suelo, la dinámica de los nutrientes, la productividad de

las plantas y la actividad biológica de los organismos del suelo (Chapin III et al., 2014). Por ejemplo, la humedad del suelo regula la difusión de oxígeno en la matriz del suelo, y a través de ello afecta la actividad de los microorganismos, la respiración de las raíces de las plantas y, en última instancia, la productividad primaria de los ecosistemas (Osman, 2013).

Dada la influencia que tiene la humedad sobre la disponibilidad de agua para las plantas y los procesos biogeoquímicos del suelo, su estudio se realiza de manera frecuente con fines de investigación y de manejo agrícola. A continuación, se explica el método gravimétrico para determinar la humedad de los suelos y un método para estimar la retención de agua a capacidad de campo.

La humedad también se puede expresar en porcentaje con relación al peso húmedo del suelo, generando valores diferentes a su expresión con base en peso seco. Por esto cuando se reportan los datos de humedad se debe especificar la forma en que es expresada.

II. Método

2.1. Principio

El método gravimétrico determina la humedad mediante el cálculo de la diferencia en peso del suelo en fresco (húmedo) y en estado seco, después de haber secado el suelo en una estufa a 105 °C hasta el peso constante (Semarnat, 2002). La humedad se expresa normalmente en porcentaje, con relación al peso seco del suelo (van Reeuwijk, 1993; Semarnat, 2002). La determinación de la humedad a capacidad de campo se basa en la definición del mismo concepto: es la cantidad de agua retenida en un suelo después de que el agua gravitacional excedente ha drenado y después de que la tasa de movimiento descendente del agua haya disminuido materialmente, lo cual ocurre normalmente después de 48 a 72 h de la saturación, aunque ello depende de la textura y estructura del suelo (Sarkar y Haldar, 2005).

2.2. Materiales y equipos

Para determinar la humedad actual

| |
|-----------------------------|
| Materiales |
| Charola de aluminio pequeña |
| Espátula |
| Marcador indeleble |
| Tubito de vidrio |
| Equipos |
| Horno para secar |
| Balanza |

HUMEDAD

Para determinar la retención de agua a capacidad de campo

| Materiales |
|---|
| Tubos de PVC de 40 cm de largo por 6-7 cm de diámetro |
| Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Malla de nylon de 0.5 a 2 mm de diámetro |
| Algodón comercial |
| Parafilm |
| Ligas |
| Equipos |
| Horno para secar |
| Balanza |

2.3. Procedimiento

2.3.1. Para determinar la humedad actual

- a) *Pesado de la muestra en fresco.* Pesa una charola de aluminio en una balanza, y anota su peso. Dentro de la charola de aluminio, pesa 15 g de suelo fresco. Ten la precaución de tarar la balanza antes de pesar el suelo.
- b) *Secado de la muestra.* Coloca la charola de aluminio con suelo dentro del horno a 105 °C y seca hasta que la muestra mantenga un peso seco constante. Cada vez que extraigas la muestra del horno para su pesado, debes dejarla enfriar dentro de un desecador durante 10 min antes de pesarla.
- c) *Pesado en seco.* Una vez determinado el peso seco del suelo con la charola de aluminio, resta el peso de la charola para determinar el peso seco del suelo.

2.3.2. Para retención de agua a capacidad de campo

- a) *Preparación del núcleo de suelo.* Tapa un extremo del tubo de PVC con una malla de nylon de 0.5 a 2 mm de diámetro recubierta por una película (2-3 mm) de algodón del lado del tubo, usando una liga. Tamiza el suelo fresco por un tamiz de 2 mm. Introduce el suelo dentro del tubo de manera uniforme, dejando aproximadamente 10 cm de la parte superior del cilindro sin llenar. Ten cuidado de no dejar poros grandes dentro del cilindro y de mantener una densidad aparente similar a la del campo. Por ejemplo, si el volumen interno del tubo es de 848.2 cm³ (30 cm de altura y 6 cm de diámetro del tubo) y la densidad del suelo es de 1 g/cm³, requerirás 848.2 g de suelo seco. Después, empaca el suelo dentro del tubo e introduce el tubito de vidrio hasta la parte media del suelo para que se facilite el escape del aire durante el humedecimiento.

- b) *Humedecimiento*. Riega suficiente cantidad de agua sobre el suelo de tal forma que se saturen los primeros 25 cm, dejando secos los últimos 5 cm del fondo. Sella la parte superior del tubo con parafilm para evitar la pérdida de agua por evaporación.
- c) *Drenado del agua*. Deja reposar durante 48 a 72 h para que el agua gravitacional drene.
- d) *Toma de muestra*. Cuando el exceso de agua se haya drenado, toma tres muestras de la zona húmeda de la parte media del núcleo, dejando aproximadamente 5 cm del suelo superior e inferior.
- e) *Determinación de humedad*. De cada muestra, determina el contenido de humedad a capacidad de campo por el método gravimétrico, secando las muestras de suelo en el horno hasta el peso constante.

Los valores de capacidad de campo determinados en condiciones de laboratorio generalmente no coinciden con los que son determinados en campo debido a que en el laboratorio se alteran las condiciones naturales del suelo, como su estructura. Cuando se requiere tener un valor más aproximado de la retención de agua a las condiciones en campo se sugiere seguir el método descrito por Sarkar y Haldar (2005).

III. Cálculos

La humedad gravimétrica se calcula con la siguiente ecuación (4.1):

$$\theta_g = \frac{(PF-PS)}{PS} * 100$$

Donde:

- θ_g = humedad gravimétrica (%)
- PF = peso fresco del suelo (g)
- PS = peso seco del suelo (g)

La humedad volumétrica se calcula con la siguiente ecuación (4.2):

$$\theta_v = \frac{(PF - PS)}{PS} * DA / D_{agua}$$

Donde:

- θ_v = humedad volumétrica (cm³/cm³)
- PF = peso del suelo húmedo (g)
- PS = peso del suelo seco (g)
- DA = densidad aparente del suelo (g/cm³)
- D_{agua} = densidad del agua (g/cm³)

Nota que para calcular la humedad volumétrica es necesario conocer la densidad aparente del suelo y la densidad del agua. En el capítulo 3 se explica cómo determinar la densidad aparente de un suelo y se presenta una tabla con valores genérico. La densidad del agua a temperatura ambiente se puede asumir que tiene un valor de 1 g/cm³.

IV. Interpretación

La humedad a capacidad de campo representa la cantidad de agua que puede retener un suelo en contra de la fuerza de la gravedad, así como también el límite superior del intervalo de humedad disponible en la relación suelo-agua-planta (Sarkar y Haldar, 2005). En este sentido, la capacidad de campo es determinada con frecuencia para estudiar la disponibilidad de

agua para las plantas y/o la dinámica del agua en los ecosistemas, a partir de balances hídricos. Como se menciona en la introducción, la diferencia entre la humedad a capacidad de campo y en el punto de marchitez permanente permite estimar el agua disponible para las plantas. De acuerdo con esto, en la Tabla 4.1 se presentan estimaciones de retención de agua a capacidad de campo, punto de marchitez y agua disponible para suelos con diferentes clases de textura, los cuales pueden ser usados como referencia para comparar los resultados obtenidos.

La humedad específica o volumétrica del suelo se determina frecuentemente en suelos agrícolas para el manejo del riego, con previo conocimiento de las capacidades de retención de agua del suelo a capacidad de campo y punto de marchitez (Brady y Weil, 2013). Asimismo, los valores de humedad específica son frecuentemente usados para realizar transformaciones de valores de peso húmedo del suelo a valores de peso seco cuando se hacen estimaciones de concentración de nutrientes o materia orgánica con referencia a suelos secos. Nota que para hacer transformaciones de peso húmedo a peso seco se debe de multiplicar el peso húmedo de la muestra del suelo por el cociente peso seco (g) / peso húmedo del suelo (g).

Tabla 4.1. Capacidad de retención de agua de suelos con diferentes características de textura y estructura (modificado de Hazelton y Murphy, 2007)

| Grupo | Característica | Capacidad de campo (10 kPa) (% volumen) | Punto de marchitez (1,500 kPa) (% volumen) | Agua disponible | |
|-------|--|---|--|-----------------|------|
| | | | | % volumen | mm/m |
| 1 | Sin estructura, arenosos a franco arenosos (5.2% de arcilla) | 20 | 4 | 16 | 160 |
| 2 | Estructura débil, franco arenoso (21.7% de arcilla) | 30 | 10 | 20 | 200 |
| 3 | Estructura débil, franco arcillo arenoso a franco arenoso (24.1% de arcilla) | 29 | 17 | 12 | 120 |
| 4 | Franco arcilloso a franco arcilloso limoso (38% de arcilla) | 40 | 16 | 24 | 240 |
| 5 | Franco a franco limoso con materia orgánica y estructura fina (28.7% de arcilla) | 48 | 20 | 28 | 280 |
| 6 | Estructura gruesa, arcilloso ligero a medio (44% de arcilla) | 38 | 25 | 13 | 130 |

| | | | | | |
|---|---|----|----|----|-----|
| 7 | Estructura moderada, arcilloso medio (50% de arcilla) | 41 | 29 | 12 | 120 |
| 8 | Estructurado, arcilloso medio a muy arcilloso (55% de arcilla). | 47 | 34 | 13 | 130 |

V. Autoevaluación

1. ¿De qué maneras se puede expresar la humedad del suelo (señala las unidades)?
2. ¿Cuál es la diferencia entre el fenómeno de cohesión y el de adhesión de la molécula de agua?
3. ¿Cuál es la diferencia entre un suelo saturado y un suelo a capacidad de campo?
4. ¿Qué es el punto de marchitamiento?
5. ¿En qué consiste el método gravimétrico?
6. Con los datos de peso fresco (PF), peso seco (PS) y densidad aparente (DA) del suelo que se presentan en la siguiente tabla, calcula la humedad gravimétrica (θ_g) y volumétrica (θ_v). Asume que la densidad del agua es de 1 gr/cm^3 .

| PF (g) | PS (g) | DA (g/m^3) | θ_g (%) | θ_v (cm^3/cm^3) |
|--------|--------|-----------------------|----------------|--|
| 45 | 39 | 0.8 | | |
| 20 | 15 | 0.95 | | |
| 15 | 10 | 1.2 | | |

Color del suelo

Carlos Antonio Anaya Merchant



En este capítulo se espera que el alumno reconozca la importancia de analizar el color del suelo y que aprenda a determinarlo de acuerdo con la clasificación de Munsell.

I. Introducción

El color es una de las características más evidentes del suelo. Esta característica no tiene una influencia directa sobre procesos ecológicos en el suelo. Sin embargo, el color afecta el **albedo** y la temperatura del suelo, y a través de ello puede influir de manera indirecta sobre la evapotranspiración, la pérdida de formas gaseosas de nutrientes y la actividad de los microorganismos, los agentes y procesos formadores del suelo (i.e. **pedogenéticos**), tales como el tipo de material parental, la adición de materiales orgánicos e inorgánicos, y los procesos de transformación, translocación y pérdida de materiales (Binkley y Fisher, 2012). Por ello, el color brinda información sobre la presencia de ciertos minerales y sales, la concentración de materia orgánica, la aireación, el régimen de humedad y la actividad de procesos de **oxidación** y **reducción** (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, los suelos oscuros, en comparación con los claros, tienen menor albedo y absorben más radiación solar, por lo que pueden llegar a alcanzar mayores temperaturas, tener un mayor rango de variación en su temperatura diaria y presentar una mayor tasa de evapotranspiración, aunque esto depende de su contenido de humedad (Brady y Weil, 2013).

El color de un suelo resulta de la presencia y acción de los agentes y procesos formadores del suelo (i.e. pedogenéticos), tales como el tipo de material parental, la adición de materiales orgánicos e inorgánicos, y los procesos de transformación, translocación y pérdida de materiales (Binkley y Fisher, 2012). Por ejemplo, los **suelos salinos** que acumulan sales solubles como cloruros y sulfatos de sodio, calcio y magnesio suelen generar una coloración clara en la capa superficial (Brady y Weil, 2013). El color rojo normalmente está relacionado con una alta concentración de manganeso y óxido de hierro no hidratado y con buenas condiciones de oxidación asociadas a una buena aireación. En contraste, una coloración en la gama del gris o azul es indicativa de un proceso de reducción del hierro y manganeso como consecuencia de una baja concentración de oxígeno por mala aireación y probable saturación de agua, patrón de color conocido como gléyico (IUSS, 2007). En suelos donde la aeración presenta una variación temporal alta (por la existencia de periodos secos y con exceso de agua), durante los periodos secos el hierro y el manganeso solubles tienden a oxidarse y formar un **precipitado**, que se evidencia por

La humedad afecta la temperatura del suelo a través de la absorción de calor por su capacidad calorífica y a través de la pérdida de calor por evaporación (i.e. flujo de calor latente).

La precipitación de una sustancia se refiere a su paso de forma soluble a una forma insoluble debido a una reacción química, como puede ser su oxidación.

la generación de manchas moteadas de colores rojo y amarillo que son indicadoras de un drenaje inadecuado por algunos periodos del año y posibles problemas para el crecimiento de cultivos (FAO, 2009). La información que brinda el color del suelo es usada para inferir la presencia de minerales y sales, concentración de materia orgánica, presencia de contaminantes, evidencia de **procesos de óxido-reducción** y con fines de clasificación de **horizontes del suelo** (FAO, 2009; Osman, 2013).

El color del suelo normalmente se expresa de acuerdo con la clasificación de colores de Munsell (FAO, 2009; Soil Survey Staff, 2014), la cual diferencia los colores a partir de tres características principales de estos: el matiz, la claridad o brillantez y la pureza. A continuación, se presenta el método para determinar el color de un suelo de acuerdo con esta clasificación.

II. Método

2.1. Principio

La determinación del color del suelo se realiza por un método colorimétrico visual, el cual consiste en la comparación visual del color de una sustancia problema, en este caso el suelo, con una serie de patrones de referencia, hasta conseguir la coincidencia. En el presente método el patrón de referencia es la clasificación de colores Munsell, la cual clasifica los colores a partir de tres características principales: a) Hue o matiz, b) Value o claridad y c) Cromo o pureza. El Hue o matiz es el color preponderante dentro del espectro electromagnético, por lo que está relacionado con la longitud de la onda lumínica que se exhibe de manera dominante. Las notaciones de color Munsell incluyen todos los matices de la región visible del espectro electromagnético. Sin embargo, para la clasificación en suelos sólo se usan cinco de ellos: rojo (R), amarillo (Y), verde (G), azul (B) y púrpura (P); así como, cinco matices más que se generan de la combinación de estos: amarillo-rojo (YR), verde-amarillo (GY), azul-verde (BG), púrpura-azul (PB) y rojo-púrpura (RP) (Munsell color, 2015). En la notación Munsell, el símbolo del matiz corresponde a la inicial del color en inglés, precedido por un número del 0 al 10. Dentro de este intervalo de valores, el matiz se vuelve más amarillo y menos rojo conforme el número incrementa. La parte media del intervalo es el 5, y el punto 10 corresponde al punto 0 del matiz siguiente (Munsell color, 2015). Así, 5YR es la mitad del matiz amarillo-rojo, el cual va de 10R (o 0YR) a 10YR (o 0Y). El Value o claridad denota el grado de oscuridad del matiz en términos del grado de blanco o negro que tiene. Éste se relaciona con la cantidad de luz que percibe el ojo, bajo una condición estándar de iluminación, y se especifica en una escala de 1 (oscuro) a 8 (claro). El Cromo o pureza del color indica la proporción de gris que se mezcla con el color base, y sus valores se extienden en la escala de 1 (pálido, gris neutro) a 8 (nítido), sin necesariamente alcanzar un valor de 8.

La determinación del color se lleva a cabo de manera visual a través de la comparación del suelo con una carta de color Munsell (FAO, 2009). Esta carta presenta alrededor de 450 colores, ordenados en planas que se diferencian por tener un matiz constante, el cual se muestra en la parte superior derecha. Cada plana presenta una serie de plaquitas de colores sistemáticamente organizadas de acuerdo con sus valores de claridad y pureza (Figura 5.1). Los niveles de claridad se presentan en sentido vertical, incrementando su valor de abajo hacia arriba, mientras que los niveles de pureza se presentan en sentido horizontal, con un incremento de izquierda a derecha (Munsell color, 2015).

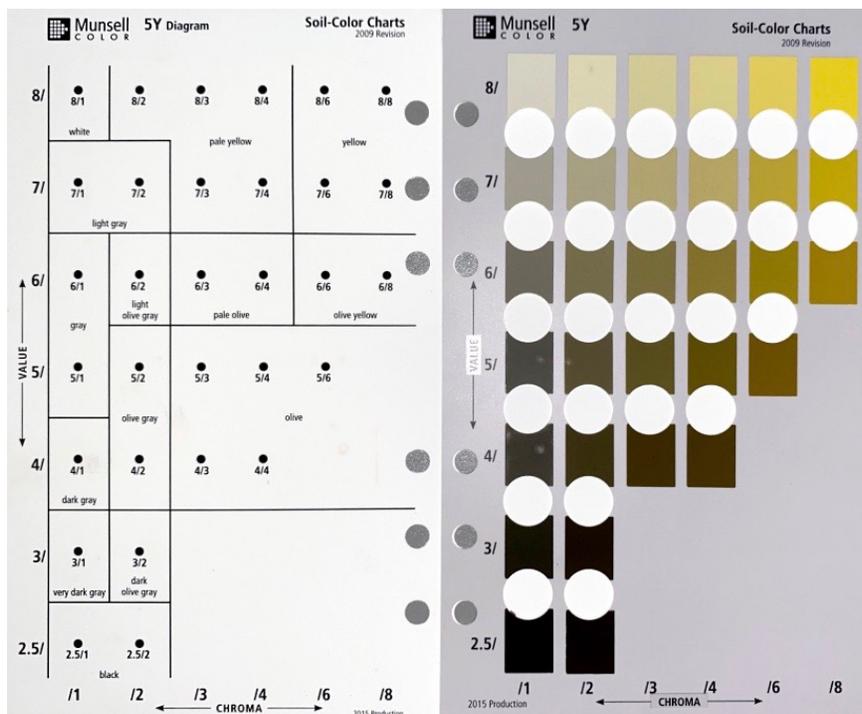


Figura 5.1. Extracto de una carta de color del suelo Munsell. Se muestra el Hue o matiz 5Y, con sus gradaciones de Cromo o pureza en sentido horizontal y Value o claridad en sentido vertical (Munsell color, 2015).

El color del suelo se describe para un horizonte o capa de suelo particular, la cual se expone mediante una excavación para ver si tiene un color relativamente homogéneo o presenta una mezcla de colores (FAO, 2009). La descripción del color se realiza sobre una muestra de suelo húmeda o en ambas condiciones: húmeda y seca; y de preferencia se debe de realizar con luz natural y cuando el sol no esté bajo en el horizonte ya que la calidad de la luz determina la apreciación del color (FAO, 2009). También, puede ser conveniente realizar las determinaciones *in situ* para tener una mejor interpretación de esta variable, sobre todo cuando se pretende describir un perfil de un suelo, ya que ello puede permitir relacionar el color con otras variables, como la estructura y grosor de los horizontes del suelo, el contraste de color entre horizontes adyacentes y la presencia de moteados.

2.2. Materiales y equipos

| Materiales |
|--------------------------------------|
| Plato o cápsula de porcelana pequeña |
| Agua limpia |
| Equipos |
| Tablas de color Munsell |

2.3. Procedimiento

- Toma una muestra de suelo, preferentemente un agregado o ped entre 1 y 3 cm de diámetro, y colócala sobre un plato de porcelana. Es importante que evites usar muestras que hayan sido alteradas o hayan pasado por una alta manipulación, como puede ser el tamizado por una malla fina, porque ello puede cambiar la apreciación del color.
- En caso de que la muestra esté seca, humedécela ligeramente con unas gotas de agua, sin llegar hasta el punto de que brille.
- Compara el color del suelo con las tablas de colores de Munsell. Primero selecciona la lámina con el matiz (Hue) que se perciba más semejante al color del suelo. Posteriormente, compara el color del suelo con el de las plaquitas que denoten la claridad y pureza que más se asemejen al de la muestra, hasta encontrar el Value y Croma más semejantes. Para ello puedes colocar la muestra de suelo en el orificio que se ubica junto a la plaquita seleccionada, haciendo uso de la mica de plástico que acompaña a la tabla para no ensuciar la lámina. Si tienes dudas, repite el procedimiento en otras láminas con diferente matiz hasta encontrar el color que más semejanza tenga con el color del suelo.
- Si el suelo presenta más de un color se identifican los colores dominantes y se describe como moteado (FAO, 2009).

III. Expresión de datos

El color del suelo se expresa siguiendo la notación de color Munsell, la cual sigue el siguiente orden: Hue (matiz), Value (claridad), Croma (pureza), con un espacio entre la letra del matiz y el número de claridad, y una vírgula entre los números de claridad y pureza. Además, seguido de la notación se indica el color del suelo correspondiente a ésta entre paréntesis. Por ejemplo, la notación para un suelo con matiz de tonalidad 5YR, claridad 5 y pureza 6 es: 5YR 5/6 (rojo amarillento).

IV. Interpretación

El color del suelo es usado como un indicador visual de la concentración relativa de materia orgánica, humedad, los estados de oxidación y reducción, drenaje y composición mineralógica del suelo; como se describe a continuación:

- a) Las coloraciones oscuras entre gris oscuro a negro pueden estar asociadas a altas concentraciones de materia orgánica muy descompuesta, denotando alto contenido de humus. Por ejemplo, los suelos superficiales que desarrollan condiciones anaerobias debido a un mal drenaje suelen presentar una coloración oscura, casi negra, debido a la acumulación de materia orgánica (Binkley y Fisher, 2012).
- b) Los colores entre amarillo a marrón suelen ser indicativos de suelos bien drenados con condiciones oxidantes (Brady y Weil, 2013).
- c) Si el drenaje es intermedio, se pueden generar moteados rojo-amarillento que denotan condiciones alternantes de procesos de oxidación y reducción como consecuencia de la fluctuación en la humedad (Brady y Weil, 2013).
- d) La presencia de minerales de hierro oxidados puede producir coloraciones rojizas, pardas y amarillentas. Por ejemplo, el color rojizo es común en suelos muy intemperizados de regiones tropicales y subtropicales, que se desarrollan bajo condiciones aeróbicas, y se asocia a la presencia de hematita (Fe_2O_3). En estas mismas regiones, un color pardo rojizo o pardo puede estar relacionado con la presencia de goetita ($\text{FeO}\cdot\text{OH}$), el cual es un oxihidróxido de hierro; mientras que una coloración amarillenta puede ser indicativa de la presencia de limonita ($\text{FeO}(\text{OH})\cdot n\text{H}_2\text{O}$), la cual es un óxido de hierro hidratado (Brady y Weil, 2013; Tan, 2010).
- e) Cuando los suelos rojos tienen una alta concentración de materia orgánica adquieren un color caoba, pero si la concentración de materia orgánica es baja se mantienen en un rojo brillante (Binkley y Fisher, 2012).
- f) El color gris claro y blanco se presenta en suelos poco intemperizados con roca madre de color gris o blanco por lo que suelen observarse en zonas áridas y semiáridas. También estos colores claros se encuentran en suelos con depósitos de carbonato de calcio (CaCO_3), capas con acumulación de sales y como resultado de la remoción de hierro, donde se acumulan minerales ricos en sílice como cuarzo, feldespatos y caolinita (Tan, 2010).
- g) Las coloraciones azules y verdosas en subsuelos son indicativas de compuestos de hierro bajo condiciones de poca aireación debida a un drenaje deficiente y con largos periodos de humedad a lo largo del año. Los colores azul y verde olivo se han asociado a la presencia de formas de hierro reducidas, como la livianita de color azul, o la nontronita, clorita o glaucomita de coloraciones verde (Brady y Weil, 2013).

- h) En ambientes húmedos, el color gris en subsuelos se ha asociado a la presencia de óxido férrico bajo condiciones ácidas (Brady y Weil, 2013).

El color es usado en la clasificación de las capas y horizontes de los suelos, así como en la identificación de procesos pedogenéticos. Para revisar la interpretación del color para estos fines se sugiere consultar la Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (IUSS, 2007), la Guía para la descripción de suelos base referencia (FAO, 2009) y el manual para la descripción de suelos (Soil Survey Staff, 2014).

V. Autoevaluación

1. ¿En qué consiste el método colorimétrico visual?
2. ¿En qué consisten las propiedades del color de matiz, claridad y pureza?
3. Completa la siguiente tabla sobre color del suelo, anotando la notación de color Munsell correspondiente.

| Hue | Value | Croma | Notación |
|-----|-------|-------|----------|
| 5Y | 8 | 8 | |
| 5Y | 4 | 1 | |
| 5Y | 6 | 4 | |

4. Menciona una posible interpretación de los colores de suelo en húmedo que se presentan en la siguiente tabla:

| Color | Capa | Interpretación |
|-----------|-------------|----------------|
| 7.5R 3/8 | Superficial | |
| 7.5YR 3/1 | Superficial | |
| 10YR 8/1 | Superficial | |
| 10Y 5/2 | Subsuelo | |

II. Propiedades químicas

El suelo puede considerarse como una entidad química dado que sus componentes son, por naturaleza, sustancias químicas (Osman, 2013). El suelo está compuesto por una mezcla de minerales, materia orgánica, agua y aire (Brady y Weil, 2013), y por razones prácticas la química de suelos está relacionada con el estudio de la composición, estructura y cambios que sufren dichos componentes por las interacciones entre sí y con la biósfera, hidrósfera, litósfera y atmósfera (Tan, 2010). De acuerdo con Tan (2010), la química de los suelos trata sobre el estudio de las características químicas de éstos, con una tendencia hacia su aplicación en la edafología, la ciencia de la nutrición y el crecimiento de las plantas, y la **pedología**, la ciencia de la formación o génesis del suelo. No obstante, con la creciente problemática ambiental, la química de los suelos también se ha ido enfocando hacia el estudio de los contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo que perjudican a los seres vivos, los ecosistemas y la salud humana (Tan, 2010). En el presente manual, el enfoque que se sigue es de corte edafológico, por lo que está orientado a evaluar los niveles de formas disponibles de nutrientes para las plantas, la cantidad de materia orgánica del suelo y otras propiedades químicas que determinan la **calidad del suelo** para el crecimiento de las plantas y los microorganismos. No obstante, algunas de las propiedades que se abordan también son importantes en los otros enfoques de la química del suelo.



Salinidad



Carlos Antonio Anaya Merchant
Nefalí Razo Pérez

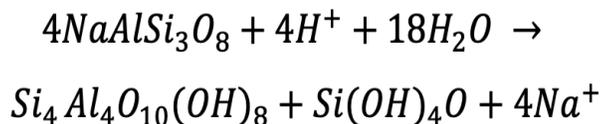
En este capítulo se espera que el estudiante aprenda qué son y cuáles son las principales sales del suelo, qué problemas causa el exceso de sales en el suelo y cómo analizar el contenido de sales a través de la medición de la conductividad eléctrica.

I. Introducción

En los suelos, la salinidad se refiere a la concentración de **sales** solubles o disueltas de la matriz del suelo, más precisamente en extractos acuosos de una muestra de suelo (Rhoades, 1996). Las sales son compuestos iónicos formados por la combinación de cationes (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+) y aniones (Cl , SO_4^{-2} , HCO_3^- , CO_3^{-2} , NO_3^-). Entre las sales solubles más comunes en el suelo, están el cloruro de sodio (NaCl), carbonato de sodio (Na_2CO_3), sulfato de magnesio (MgSO_4), cloruro de magnesio (MgCl_2), sulfato de calcio (CaSO_4), cloruro de calcio (CaCl_2), entre otras. La mayoría de los aniones y cationes disociados de las sales solubles son nutrientes para las plantas y microorganismos, por lo que los suelos con un buen balance de ellas se consideran fértiles (Sposito, 2008). No obstante, en algunos suelos se pueden acumular ciertas sales a concentraciones altas que perjudican la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y la actividad de los microorganismos. A estos suelos con acumulación de sales se les denomina salinos, y al proceso de acumulación de sales se le denomina salinización. Actualmente la salinización se reconoce como uno de los problemas globales más importantes, que afecta a alrededor de 831 millones de hectáreas de cultivos agrícolas (Rengasamy, 2006).

Las sales solubles del suelo derivan principalmente del intemperismo químico de los minerales del suelo, es decir de la transformación química de los minerales del suelo por reacciones con la solución del suelo y los gases atmosféricos (Chapin III et al., 2014). No obstante, también pueden derivar de otras fuentes, como la descomposición de la materia orgánica, el **depósito atmosférico**, la fertilización y el riego en el manejo agrícola (Brady y Weil, 2013). En el caso del intemperismo, uno de los principales procesos químicos que genera solutos es la hidrólisis de minerales. Por ejemplo, la hidrólisis en la que algunos iones de los minerales son desplazados por el hidrógeno (H^+), resulta en la formación de sales de ácido silícico y bicarbonato de sodio, potasio, calcio o magnesio (Brady y Weil, 2013); en el caso del mineral albita ($4\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$, un feldespato) su hidrólisis resulta en la formación de un mineral de arcilla (caolinita, $\text{Si}_4\text{Al}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$), ácido silícico y sodio (ecuación 6.1):

Cuando la sal predominante en un suelo salino es el sodio en forma de carbonato o bicarbonato de sodio (NaHCO_3) o cloruro de sodio (NaCl), al suelo se le denomina sódico.



La concentración de sales solubles en los suelos varía considerablemente en el espacio, tanto horizontal como verticalmente, como consecuencia de los factores formadores de los suelos (principalmente: material parental, clima y relieve) y procesos formadores de los mismos (i.e. entradas, salidas, transformación y translocación de materiales) (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, la infiltración de agua de lluvia en el suelo lixivia materiales de manera vertical, los cuales pueden acumularse en algunas capas del suelo subsuperficiales; de igual forma, pero en sentido inverso, el aumento del nivel freático en algunas áreas puede producir la translocación de los solutos de horizontes del subsuelo al horizonte superficial (Chapin III et al., 2014). Cuando la lixiviación de las sales es limitada por una escasa precipitación, las sales pueden acumularse en la capa superficial del suelo, lo cual explica la tendencia de los ecosistemas áridos y semiáridos a presentar suelos salinos (Osman, 2013). El relieve es otro factor determinante en el movimiento y acumulación de solutos en las diferentes geoformas (i.e. formas del relieve) del paisaje. Por ejemplo, los escurrimientos subsuperficiales y profundos de agua de las laderas hacia las planicies generan la acumulación de materiales en estas últimas, incluyendo a las sales solubles (Brady and Weil, 2013).

Las especies de plantas difieren ampliamente en su capacidad para tolerar la salinidad; a las plantas adaptadas a suelos salinos se les denomina halófitas, mientras que a las plantas que no son nativas de suelos salinos pero que toleran cierta salinidad se le denomina glicófitos o halotolerantes (Rengasamy, 2006). La tolerancia a la salinidad es una característica compleja de las plantas, ya que depende de funciones fisiológicas y bioquímicas controladas genéticamente, y cuya respuesta puede ser afectada por factores como temperatura, humedad, etapa de crecimiento de la planta, el tipo de sales y la fertilidad del suelo (Zhu, 2001; Rengasamy, 2006). La salinización tiene tres efectos principales sobre el crecimiento de las plantas: efectos osmóticos, efectos iónicos específicos y desequilibrios nutricionales (Brady y Weil, 2013). A través de su efecto osmótico, las sales reducen el potencial hídrico del suelo, resultando en una disminución de la capacidad de las raíces para absorber agua (Brady y Weil, 2013). Los efectos iónicos específicos se refieren a la sensibilidad que tienen algunas especies de plantas a altas concentraciones de ciertos iones. Por ejemplo, se han reportado problemas de toxicidad en plantas por altas concentraciones de sodio, calcio, potasio, cloruro y bicarbonato (Rengasamy, 2006). Los desequilibrios nutricionales o de **relaciones estequiométricas** se refieren a desbalances en la concentración de los iones; en **suelos sódicos**, por ejemplo, las concentraciones de ciertos iones importantes para las plantas como Ca^{2+} y Mg^{2+} son bajas, resultando en un suelo con limitación de estos nutrientes (Brady y Weil, 2013; Osman, 2013).

La translocación de sales del subsuelo al horizonte superficial por elevación del nivel freático es uno de los problemas más importantes de salinización en zonas deforestadas de Australia. En México una de las principales causas de salinización es el riego con agua con significativas concentraciones de sales.

En estudios donde es importante conocer de forma detallada la concentración de sales, la salinidad se mide en términos de la concentración de los principales solutos. No obstante, en muchos estudios sólo es necesario determinar la salinidad total (Brady y Weil, 2013; Osman, 2013). En este caso, la salinidad puede ser estimada a través de la **conductividad eléctrica** (CE), ya que la salinidad es directamente proporcional a la CE (Rhoades, 1996; Osman, 2013). Aquí se describe un método para medir la CE en una suspensión de suelo-agua, que puede ser usada como un indicador de la salinidad total, basado en Slavich y Petterson (1993) y Soil Survey Staff (2014).

La conductividad eléctrica de una solución se refiere a la corriente eléctrica que tiene ésta. La corriente depende de la fuerza iónica de la solución, la cual es directamente proporcional a la concentración de iones, aunque también depende de las características de estos, como su carga.

II. Método

2.1. Principio

La CE normalmente se determina por un método electroquímico, con el uso de un electrodo para medir conductividad eléctrica (i.e. conductímetro). Las mediciones con el conductímetro se pueden realizar en soluciones acuosas de suelo de cierta proporción suelo-agua, en muestras de suelos saturadas con agua o en extractos acuosos de muestras de suelo, pero cada una de estas formas de medición proporciona resultados particulares que no son directamente comparables entre sí, por lo que es importante señalar el método y la dilución suelo-agua usados para la correcta interpretación y comparación de los resultados (ver Rhoades, 1996; Soil Survey Staff, 2014). El método que se describe aquí está basado en Slavich y Petterson (1993), y consiste en medir la conductividad eléctrica en una suspensión de suelo-agua con una relación 1:5 p/v, con el uso de un electrodo para medir CE.

Los métodos electroquímicos se basan en el proceso de transferencia de electrones entre sustancias, y consideran la medición de una magnitud eléctrica básica como intensidad de corriente, carga, potencia, resistencia o conductancia, con el fin de determinar la concentración o actividad de un analito en una disolución.

2.2. Materiales y equipos

| Materiales |
|---|
| Vasos de precipitado de 150 ml |
| Matraz para aforar de 1 L |
| Agitador recíproco o varilla de agitación |
| Espátula |
| Piseta con agua destilada |
| Equipos |
| Balanza digital |
| Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Medidor de conductividad eléctrica |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|---|
| Agua desionizada (con una CE no mayor a 0.2 dS/m a 25 °C) | N. A. |
| Cloruro de potasio (KCl) 0.01 N. | Disolver 0.7456 g de KCl seco en 1 L de agua desionizada. La CE de esta solución debe ser de 1.4 mS / cm a 25 °C. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

- Seca el suelo al aire de 24 a 48 h, y tamiza por un tamiz de 2 mm de amplitud de malla.
- Pesa 15 g de suelo en un vaso de precipitado de 150 ml.
- Añade 75 ml de agua a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$). La CE es afectada por la temperatura por lo que es importante tratar de controlar esta variable a 25 °C o tener un registro de ella por motivos comparativos; se estima que la CE incrementa con la temperatura a una tasa aproximada de 1.9% por grado centígrado (Rhoades, 1996).
- Agita el contenido del vaso en un agitador recíproco por 1 h, o en su defecto, hazlo durante 1 min con una varilla de agitación a intervalos de 10 min por un período de 30 min.
- Calibra el medidor de conductividad con la solución de KCl 0.01 N. La conductividad registrada debe ser de 1.4 dS/m a 25 °C.
- Sumerge la punta del conductímetro en la parte superior de la suspensión suelo-agua. Permite que la lectura se establezca y registra el valor.

III. Cálculos y expresión de datos

El conductímetro proporciona los valores de CE de manera directa por lo que no es necesario hacer cálculos. La CE se expresa en unidades de siemens (S) y ohmios (ohm). El siemens (S) es una unidad de conductividad eléctrica y se reporta como deci-siemens por metro (dS/m) o mili-siemens por centímetro (mS/cm), mientras que el ohm es una unidad de resistencia eléctrica, y en términos de CE en suelos normalmente se expresa en mili-ohmio por centímetro (mhos/cm) (Rhoades, 1996). Para la conversión de unidades, se manejan las siguientes equivalencias: $1\text{ dS/m} = 1\text{ mS/cm} = 1\text{ mhos/cm}$.

Los valores se reportan como CE en solución suelo-agua (1:5), indicando la temperatura de la solución (Slavich y Petterson, 1993); por ejemplo, CE 1:5, 25 °C.

La CE se ha relacionado con la cantidad total de sales solubles (mg/kg o ppm) de acuerdo con la siguiente ecuación (6.2) (Hazelton y Murphy, 2007).

$$TSS = 640 * CE\ 1:5\ (dS/m)$$

Donde:

TSS = sales totales solubles (mg/kg)

La ecuación anterior fue estimada para el cloruro de sodio, por lo que puede variar dependiendo del tipo de iones presentes en el suelo (Hazelton y Murphy, 2007).

La CE también suele medirse en **extractos de saturación** acuosos (CEe) por lo que para fines interpretativos en ocasiones puede ser útil transformar los valores de CE 1:5. Para ello se usa la siguiente ecuación (6.3) (Hazelton y Murphy, 2007):

$$CEe = CE\ 1:5 * FM$$

Donde:

CEe = conductividad eléctrica en extractos de saturación (dS/m)

CE 1:5= conductividad eléctrica determinada en una solución suelo-agua, 1:5 p/v (dS/m)

FM = factor multiplicador, depende de la capacidad de retención de agua del suelo, y para su estimación normalmente se usan las clases texturales del suelo de acuerdo con la Tabla 6.1.

Los extractos de saturación son soluciones acuosas que se extraen por medio del filtrado de suelos saturados de agua.

Tabla 6.1. Factor multiplicador para convertir la conductividad eléctrica de solución suelo-agua (1:5) a conductividad eléctrica en extractos de saturación

| Textura del suelo | Factor multiplicador |
|---|----------------------|
| Arenosa, franco arenosa | 23 |
| Franco arenosa, franco arenosa fina, franco arcillo arenosa ligera | 14 |
| Franca, franco limosa, franco arcillo arenosa | 9.5 |
| Franco arcillosa, franco arcillo limosa, franco arcillo arenosa fina, arcillo limosa, ligeramente arcillosa | 8.6 |
| Ligeramente medio arcillosa | 8.6 |
| Medio arcillosa | 7.5 |
| Altamente arcillosa | 5.8 |
| Turba | 4.9 |

Fuente: modificado de Hazelton y Murphy, 2007.

IV. Interpretación

La capa superficial de un suelo con baja salinidad tiene una CE 1:5 de entre 0.03 a 0.15 dS/m (Hazelton y Murphy, 2007). Los suelos agrícolas con tratamiento con cal (5 Mg/ha) tienen una CE 1:5 de alrededor de 0.15 dS/m (Hazelton y Murphy, 2007). Los suelos salinos son aquellos que tienen una CE mayor a 4 dS/m medida en extractos de saturación, aunque muchas plantas pueden ser afectadas adversamente a CE de alrededor de 2 dS/m (Brady y Weil, 2013). En las Tablas 6.2 y 6.3 se presentan dos clasificaciones de la salinidad con base en valores de CE 1:5 y CEe, respectivamente, y su relación con las respuestas potenciales de las plantas o cultivos.

Tabla 6.2. Grado de salinidad y conductividad eléctrica (dS/m) determinada en soluciones de suelo-agua (1:5) en suelos con diferente textura

| Grado de salinidad | CE 1:5 (dS/m) suelos con diferente concentración de arcillas | | | | Respuesta de las plantas |
|--------------------|--|----------------|----------------|----------------|---|
| | 10-20% arcilla | 20-40% arcilla | 40-60% arcilla | 60-80% arcilla | |
| Muy bajo | <0.07 | <0.09 | <0.12 | <0.15 | Sin efecto |
| Bajo | 0.07-0.15 | 0.09-0.19 | 0.12-0.24 | 0.15-0.30 | Cultivos moderadamente sensibles afectados |
| Medio | 0.15-0.34 | 0.19-0.45 | 0.24-0.56 | 0.3-0.7 | Cultivos moderadamente tolerantes afectados |
| Alto | 0.34-0.63 | 0.45-0.76 | 0.56-0.96 | 0.7-1.18 | Cultivos tolerantes afectados |
| Muy alto | 0.63-0.93 | 0.76-1.21 | 0.96-1.53 | 1.18-1.87 | Cultivos muy tolerantes afectados |
| Extremo | >0.93 | >1.21 | >1.53 | >1.87 | Generalmente muy salino para el crecimiento de cultivos |

Fuente: Shaw, 1999 en Hazelton y Murphy, 2007.

Tabla 6.3. Clases de salinidad del suelo de acuerdo con su conductividad eléctrica en extractos de saturación (CEe)

| Clase de salinidad | CEe (dS/m) | Efecto sobre plantas agrícolas |
|----------------------|------------|--|
| No salino | 0-2 | Insignificante |
| Ligeramente salino | 2-4 | La producción de algunas especies puede ser restringida |
| Moderadamente salino | 4-8 | La producción de varias especies es restringida |
| Altamente salino | 8-16 | Sólo especies tolerantes se producen satisfactoriamente |
| Muy altamente salino | > 16 | Pocas especies tolerantes se producen satisfactoriamente |

Fuente: Osman, 2013.

V. Autoevaluación

1. ¿Qué son las sales? Da cuatro ejemplos de sales del suelo.
2. ¿Cuáles son los suelos sódicos?
3. Señala tres fuentes de sales del suelo
4. ¿Cómo se llama el proceso por el cual se mueven los sólidos dentro del perfil del suelo?
5. Menciona qué efectos puede tener la salinidad del suelo sobre el crecimiento de las plantas y explica uno de estos efectos.
6. ¿Cuál es el principio (o en qué se basa) el método electroquímico para determinar la concentración o actividad de iones?
7. ¿Cómo se interpretaría un valor de 0.2 dS/m medido en una solución de suelo-agua (1:5) en un suelo franco arenoso y en un suelo franco arcilloso?

pH

Carlos Antonio Anaya Merchant
Neftalí Razo Pérez



En este capítulo se espera que el estudiante reconozca la importancia del pH del suelo y aprenda a determinarlo en suspensiones acuosa y salina con el método electroquímico.

I. Introducción

El pH se ha definido como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno (H^+) de una solución (Thomas, 1996). El pH también ha sido definido como una medida del grado de acidez o alcalinidad de una solución. Un suelo se denomina ácido si la actividad de los iones H^+ en la solución es mayor a la de OH^- , y viceversa, un suelo se denomina alcalino cuando la actividad de los H^+ es menor que la de OH^- (Brady y Weil, 2013; Hazelton y Murphy, 2007). Los valores de pH se distribuyen en el intervalo de 0 a 14, donde un valor de 7 corresponde a un pH neutro en el que la actividad de los iones H^+ y OH^- es similar; a valores inferiores aumenta logarítmicamente la acidez, y a valores superiores aumenta la alcalinidad (Thomas, 1996).

En la solución del suelo, el pH generalmente oscila dentro del intervalo de 5.5 a 7.5, el cual se considera adecuado para el crecimiento de la mayoría de los organismos. Los suelos con pH fuera de ese rango limitan considerablemente la actividad biológica y pueden presentar cambios químicos que disminuyen la disponibilidad de los nutrientes, o pueden generar problemas de toxicidad al acumularse iones que dañan a los organismos, como el aluminio en el caso de un pH muy ácido (Chang, 2012).

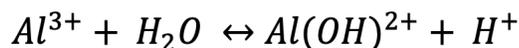
Dada la influencia del pH en las reacciones químicas en el suelo y la actividad de los microorganismos, su evaluación se realiza de manera rutinaria como un indicador de posibles problemas de disponibilidad de nutrientes, de la toxicidad de los suelos y de la presencia de ciertos cationes, con fines ecológicos y agronómicos (Brady y Weil, 2013).

El pH del suelo depende de una variedad de mecanismos que liberan o consumen iones de hidrógeno, incluyendo reacciones de **hidrólisis**, **nitrificación**, **disociación** ácida de ácidos orgánicos durante la descomposición de la materia orgánica, la formación de ácido carbónico por la respiración en el suelo, la entrada de **lluvia ácida** y la reducción u oxidación de azufre (S) y hierro (Fe) (Osman, 2013; Brady y Weil, 2013). Todos estos mecanismos actúan simultáneamente, pero su importancia relativa varía entre ecosistemas y tipos de suelo. Por ejemplo, los suelos ricos en **cationes ácidos** generalmente tienen un pH ácido,

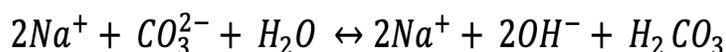
Las reacciones de hidrólisis involucran el rompimiento o disociación de la molécula de agua en los iones H^+ y OH^- (ver ecuación 7.1 y 7.2).

Los cationes ácidos son aquellos iones con carga positiva que promueven la disociación de la molécula de agua, como el Al^{3+} y el Fe^{3+} .

debido a que estos cationes promueven la hidrólisis de la molécula de agua y la subsecuente liberación de iones H^+ a la solución del suelo, como se muestra en la siguiente ecuación (7.1) (Brady y Weil, 2013):



En contraste los suelos sódicos, con carbonatos de sodio, tienden a incrementar el pH o la alcalinidad, de acuerdo con la siguiente reacción de hidrólisis (7.2) (Brady y Weil, 2013):



El pH generalmente se mide en una suspensión de suelo-agua y/o en una suspensión de suelo con una solución salina, normalmente de cloruro de calcio ($CaCl_2$, 0.01M) o de potasio (KCl, 1M) (Thomas, 1996). En el primer caso, el pH de la suspensión se asemeja al de la solución del suelo fresco en condición actual y se le denomina **pH activo** porque representa la actividad de los iones H^+ libres, los cuales pueden estar sujetos a variaciones temporales por diferentes causas, incluyendo variaciones estacionales en la humedad y salinidad del suelo (Thomas, 1996; Sarkar y Haldar, 2005). En el segundo caso, la suspensión suele producir valores de pH más estables y ácidos que cuando se determina en soluciones de agua debido a que con la inclusión de la sal se promueve la liberación de los iones H^+ que se encuentran adsorbidos en las superficies de intercambio catiónico, y se le suele denominar **pH tamponado** (Tan, 2010). Determinar el pH en una suspensión salina en vez (o, además) de una suspensión con agua tiene la principal finalidad de evitar efectos de cambios en el pH producidos por la concentración de sales naturales del suelo y cambios estacionales en éstas (Thomas, 1996; White, 2006; Soil Survey Staff, 2014).

Las sales pueden estar presentes de forma natural en el suelo o pueden adicionarse mediante el manejo agrícola (e.g. fertilización y riego con aguas salinas); y su concentración puede variar temporalmente por efecto de diversos procesos. Por ejemplo, en ecosistemas estacionales la concentración de sales suele disminuir durante la estación de lluvias por el aumento de la **lixiviación**, mientras que en ecosistemas agrícolas la concentración de sales a lo largo del año es afectada por los patrones de fertilización y crecimiento de las plantas (Brady y Weil, 2013). Las sales tienden a reducir el pH del suelo (i.e. acidificar) dependiendo de su concentración. En suelos ácidos esta reducción es relacionada con el desplazamiento de Al^{3+} de los sitios de intercambio iónico, así como con un aumento de la hidrólisis de varios compuestos de aluminio en presencia de sales, mientras que en algunos suelos alcalinos se relaciona con el desplazamiento de Ca^{2+} de los sitios de intercambio por las sales (Thomas, 1996). En general se recomienda medir el pH en suspensiones acuosas y, si se quiere amortiguar los efectos de concentración de sales, en suspensiones de $CaCl_2$ o KCl (Thomas, 1996; White, 2006; Soil Survey Staff, 2014). Aquí se explican los métodos para determinar el pH activo y el pH tamponado.

La lixiviación arrastra las sales o materiales en disolución y suspensión a través de la matriz del suelo.

Los sitios de intercambio son aquellas áreas superficiales de las arcillas y de la materia orgánica que presentan una carga negativa, y que por ello tienen la capacidad de atraer y liberar cationes de la solución del suelo (ver capítulo 9).

II. Método

2.1. Principio

La determinación del pH por el método electroquímico se lleva a cabo con el uso de un potenciómetro o medidor de pH. El potenciómetro tiene un electrodo de vidrio, el cual es inmerso en una suspensión de suelo-agua que simula la solución del suelo. El potenciómetro determina la diferencia en la actividad de los iones H^+ que existe entre la solución del suelo y el electrodo de vidrio, y a partir de esta diferencia genera un potencial electrométrico que se relaciona directamente con el pH del suelo. Hay que tener cuidado con la relación suelo-agua de la suspensión, debido a que ésta influye sobre los valores que se obtienen; entre mayor sea esta relación, el valor de pH tenderá a incrementar, aunque este incremento no es lineal (Soil Survey Staff, 2014). Las relaciones suelo-agua más aceptadas son la 1:1, 1:2 y 1:5 p/v (Robertson et al., 1999; Thomas, 1996; White, 2006). Como se mencionó antes, la determinación de pH en una solución salina generalmente produce valores más ácidos y valores más estables cuando se analiza el pH a lo largo del tiempo, esto es debido a que esta solución proporciona iones Ca^{2+} o K^+ que desplazan los iones hidronio y aluminio que se encuentran en las superficies de intercambio y los libera a la solución del suelo, resultando en mediciones de pH que tienen una menor variación estacional (Thomas, 1996). Aunque aparentemente los métodos son muy sencillos, los procedimientos deben seguirse cuidadosamente para obtener resultados confiables.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Vasos de precipitado de 100 ml |
| Matraz para aforar de 1 L |
| Agitador magnético o varilla de agitación |
| Espátula |
| Piseta con agua destilada |
| Equipos |
| Balanza |
| Tamiz de 2 mm de amplitud de malla (No. 10) |
| Medidor de pH (potenciómetro) |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|--|--|
| Agua destilada | N. A. |
| Cloruro de calcio (CaCl_2) 0.01M | Disolver 1.156 g de CaCl_2 en 1 L de agua destilada |
| Cloruro de potasio (KCl) 1M | Disolver 74.56 g de KCl en 1 L de agua destilada |
| Buffers de calibración con pH 7.0, 4.0 y 10.0. | N. A. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

pH en agua

- Pesa 20 g de suelo fresco previamente tamizado por un tamiz de 2 mm y colócalo en un vaso de precipitado de 100 ml.
- Agrega 40 ml de agua destilada para formar una suspensión suelo-agua con relación 1:2 p/v.
- Agita la solución por 30 min con un agitador magnético, y posteriormente deja reposar la suspensión por 2 min para que ésta se equilibre. Si no cuentas con un agitador, puedes usar una varilla de vidrio. En este caso se agita la muestra con la varilla a intervalos de 5 min durante 30 min (Semarnat, 2002).
- Calibra el medidor de pH de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Normalmente se calibra el potenciómetro con dos soluciones buffer, una de pH 4 y otra de pH 10 o 7. Después de calibrarlo, debes enjuagar el electrodo con agua destilada.
- Mide el pH del suelo. De acuerdo con Thomas (1996) el electrodo puede ser colocado en el sobrenadante que está por encima del suelo o introduciendo el electrodo en la solución de suelo, lo importante es hacer los análisis de la misma forma en todas las muestras. En esta práctica se va a medir el pH dentro de la solución de suelo, para ello inclina ligeramente el vaso con la solución del suelo e introduce el electrodo en el centro del vaso, después regresa el vaso a su posición horizontal sobre la mesa. Espera a que se estabilice el pH y apunta el valor.
- Lava el electrodo con agua destilada con el uso de una piseta, y seca con una sanita antes de hacer otra medición o de guardarlo en una solución buffer.

pH en CaCl_2 o KCl

- Pesa 20 g de suelo fresco y colócalos en un vaso de precipitado de 100 ml.

pH

- b) Agrega 40 ml de una solución 0.01 M de CaCl_2 o de 1 M KCl dentro del vaso para formar una suspensión suelo-solución salina con relación 1:2 p/v. Posteriormente, sigue los pasos c al f del procedimiento anterior para determinar el pH activo.

III. Cálculos

El potenciómetro brinda directamente el valor de pH por lo que no se requiere hacer ningún cálculo. Los valores de pH no tienen unidades, pero es importante recordar que éstos están en escala logarítmica por lo que cambios en una unidad equivale a un aumento o disminución de 10 veces la actividad de los iones H^+ . Cuando se reporta un valor de pH es preciso indicar si fue determinado en agua o en una solución salina, y la relación suelo-agua o suelo-solución salina empleada (Thomas, 1996; Hazelton y Murphy, 2007).

IV. Interpretación

El pH activo ha sido clasificado con base en su acidez y alcalinidad de acuerdo como se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Clasificación de la acidez y alcalinidad del suelo de acuerdo con su pH activo (pH en solución suelo: agua 1:5 p/v)

| Clasificación | pH |
|--------------------------|---------|
| Muy fuertemente ácido | 4.5-5 |
| Fuertemente ácido | 5.1-5.5 |
| Moderadamente ácido | 5.6-6 |
| Ligeramente ácido | 6.1-6.5 |
| Neutro | 6.6-7.3 |
| Ligeramente alcalino | 7.4-7.8 |
| Moderadamente alcalino | 7.9-8.4 |
| Fuertemente alcalino | 8.5-9 |
| Muy fuertemente alcalino | >9 |

Fuente: Hazelton y Murphy, 2007.

El pH es un indicador de diferentes características químicas de los suelos, como se indica a continuación:

- a) Presencia de ácidos libres: valores de pH muy fuertemente ácidos de entre 2 y 3 generalmente indican la presencia de un compuesto ácido libre, normalmente H_2SO_4 . De acuerdo con Thomas (1996), un pH menor a 4.0 no se puede alcanzar con una saturación de Al^{3+} , por lo que dichos valores no sólo indican una abundancia de H^+ , sino también la presencia de una fuente productora de estos. Estos valores tan ácidos suelen encontrarse en suelos afectados por la actividad minera con alto contenido del mineral pirita (FeS_2), el cual al oxidarse forma

- ácido sulfúrico y sulfato ferroso (Thomas, 1996). Con estos pH las plantas no pueden crecer.
- Presencia de iones de aluminio: valores de pH entre 4 y 5 están relacionados con altas concentraciones de iones de aluminio (Al^{3+}) intercambiables, y pueden sugerir problemas de toxicidad en plantas por el Al^{3+} (Brady y Weil, 2013; Hazelton y Murphy, 2007).
 - Presencia de hidróxidos de aluminio: en pH de 5.5 o ligeramente mayores, los iones de Al^{3+} intercambiables normalmente no se presentan con una concentración alta; en su lugar la química del aluminio puede estar dominada por una mezcla de iones de hidróxidos de aluminio no intercambiables, muy pequeños y solubles, y que pueden afectar la disponibilidad de P y K, así como el crecimiento de las raíces (Thomas, 1996).
 - Presencia de carbonato de calcio: valores entre 7.6 y 8.3 pueden indicar la presencia de carbonato de calcio (CaCO_3) en el suelo, como ocurre en suelos calcáreos (Brady y Weil, 2013).
 - Presencia de carbonato de sodio: valores de pH cercanos a 9 ya no se relacionan con la presencia de CaCO_3 , sino con la presencia de carbonato de sodio (NaCO_3); a pH mayores a 8.3, el CaCO_3 se precipita y deja de ser soluble, por lo que el NaCO_3 determina la capacidad buffer del suelo (Thomas, 1996).

El pH en agua como indicador de disponibilidad de nutrientes. El pH permite realizar inferencias sobre la disponibilidad relativa de nutrientes en la solución del suelo de acuerdo como se muestra en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Reducción en la solubilidad o en la disponibilidad de diversos nutrientes de plantas de acuerdo con el pH activo del suelo

| Elemento | pH en que la disponibilidad es muy reducida |
|-----------|---|
| Azufre | <5.0 |
| Boro | <4.5 y entre 7.5 a 8.5 |
| Calcio | <5.0 y >9.0 |
| Fósforo | <5.0 y entre 8.5 a 9.5 |
| Hierro | >7.5 |
| Magnesio | <5.0 y >9.0 |
| Manganeso | <4.5 y >8.0 |
| Nitrógeno | <5.0 y >9.0 |
| Potasio | <5.0 |

Fuente: Hazelton y Murphy, 2007.

Los valores de pH activo en suelos agrícolas generalmente se interpretan como se muestra en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Interpretación general de los valores de pH desde una perspectiva agronómica

| pH | Interpretación |
|-----------|--|
| <5.5 | El suelo es deficiente en Ca y Mg y se le debe aplicar encalado. Típicamente con deficiencia de fósforo. Probablemente las plantas tienen un crecimiento de las raíces pobre debido a la baja capacidad de intercambio catiónico (CIC) y la posible toxicidad de Al ³⁺ . |
| 5.5 a 6.5 | Es satisfactorio para muchos cultivos. El suelo puede ser bajo en carbonatos. |
| 6.5 a 7.5 | Rango ideal para la mayoría de los cultivos. El suelo típicamente tiene una alta saturación de bases intercambiables (casi el 100%) en sus superficies de intercambio. |
| 7.5 a 8.4 | Carbonato libre presente en el suelo. Por lo general, buena infiltración y percolación de agua, relacionada con la alta saturación de Ca de las arcillas. Típicamente P y micronutrientes menos disponibles. |
| >8.4 | Suele ser indicativo de suelo sódico. Malas condiciones físicas del suelo debidas a la alta concentración de sodio. Baja infiltración y percolación. Posible deterioro de las raíces de las plantas y disolución de la materia orgánica. |

Fuente: Soil Survey Staff, 2014

La medición del pH en una suspensión salina tiene la principal finalidad de obtener un valor de pH que no sea dependiente de la concentración de las sales que hay en el suelo, sobre todo cuando éstas varían estacionalmente; en otras palabras, el efecto de la concentración de las sales sobre el pH se supera o se estandariza, tomando medidas de pH en una solución salina (Thomas, 1996; Sarkar y Haldar, 2005, Soil Survey Staff, 2014).

A la diferencia numérica entre el pH activo y el pH en KCl se le conoce como pH delta (ΔpH), y proporciona información sobre la naturaleza de la distribución de carga en los coloides del suelo, lo que puede tener un efecto sobre la dinámica de los nutrientes y el manejo del suelo. Cuando esta diferencia es negativa (pH más ácido), el suelo tiene una carga negativa neta; cuando esta diferencia es positiva (pH menos ácido), el suelo tiene una carga positiva neta; cuando no hay diferencia, el suelo tiene una carga cero (Sarkar y Haldar, 2005). Por ejemplo, en Oxisoles altamente degradados se usa el ΔpH para diferenciar subgrupos de estos con carga positiva o carga cero (Soil Survey Staff, 2014).

V. Autoevaluación

1. ¿Qué es el pH?
2. ¿Qué escala tienen el pH y dentro de qué intervalo varían sus valores?
3. ¿Por qué es importante medir el pH del suelo?
4. ¿Qué factores o procesos pueden afectar el pH del suelo?
5. ¿Cuáles con los cationes ácidos?
6. ¿Qué diferencia hay entre el pH activo y el pH tamponado?
7. ¿Qué interpretación podrías dar a valores de pH de 5.5 y 8.4 desde diferentes perspectivas?

Carbono orgánico

Carlos Antonio Anaya Merchant
Neftalí Razo Pérez

8

En este capítulo se espera que el alumno reconozca la relación entre carbono orgánico y materia orgánica del suelo, identifique las funciones que realiza la materia orgánica en el suelo y aprenda el método del ácido crómico para determinar la concentración de carbono orgánico del suelo.

I. Introducción

El suelo es uno de los principales almacenes de carbono (C) orgánico en los ecosistemas terrestres. A nivel global, se estima que el contenido de carbono orgánico en los primeros tres metros de profundidad del suelo es cercano a 2,344 Pg C (Jobbágy y Jackson, 2000), lo cual es cuatro veces más que el carbono almacenado en la **biomasa** vegetal de los ecosistemas terrestres (560 Pg C) (Stockmann et al., 2013). Dada la gran cantidad de carbono orgánico en el suelo (COS), se sugiere que una reducción menor en él puede tener un efecto importante en el ciclo global del carbono. Por ejemplo, la reducción del 3% del almacén de COS (70.3 Pg) como consecuencia de un aumento de la descomposición y mineralización de la materia orgánica del suelo (MOS) resultaría en una emisión de CO₂ a la atmósfera equivalente a 7.8 veces la emisión antropogénica anual de CO₂ (9 Pg/año), lo cual produciría un incremento significativo en la concentración de este **gas de efecto invernadero** en la atmósfera y exacerbaría dramáticamente el calentamiento global (Stockmann et al., 2013).

Empíricamente se ha mostrado que el carbono representa alrededor del 50% de los elementos de la materia orgánica del suelo (MOS) (Stockmann et al., 2013), por lo que la concentración de ésta en el suelo se relaciona directamente con la del COS. La MOS ha sido definida como la mezcla de materiales orgánicos en el suelo, incluyendo restos de plantas y animales en diferentes estados de descomposición, **humus**, sustancias orgánicas solubles, carbón vegetal y biomasa microbiana (Stockmann et al., 2013).

La MOS influye sobre la estructura y funcionamiento del suelo. Por ejemplo, puede actuar como un agente cementante de las partículas minerales del suelo, y a través de ello determinar la distribución de tamaños de los agregados del suelo y la estabilidad de estos, lo cual a su vez determina la porosidad, la capacidad de aireación y la infiltración de agua en el suelo (Bronick y Lal, 2005). Por otro lado, a través de la

El término de biomasa se refiere a la masa comprendida por los organismos vivos. Ésta se puede subdividir en sus diferentes componentes, tales como biomasa de plantas o vegetal, biomasa animal, biomasa microbiana, etcétera.

Los gases de efecto invernadero tienen la capacidad de absorber y emitir radiación dentro del espectro infrarrojo; algunos ejemplos son CO₂, CH₄, N₂O y H₂O.

El humus comprende diversos compuestos orgánicos de alto peso molecular, estructura irregular y de difícil degradación que son formados por procesos de acción enzimática y de condensación.

En el capítulo 2 del presente manual se abunda más sobre el papel de la materia orgánica en la agregación del suelo.

descomposición de la MOS, los microorganismos **heterótrofos** obtienen la energía necesaria para su desarrollo, a la vez que liberan dióxido de carbono a la atmósfera y formas de nutrientes que pueden ser tomadas por plantas y microorganismos para su crecimiento. De esta forma, la MOS es considerada un componente fundamental en el flujo de energía y circulación de nutrientes en los ecosistemas terrestres (Chapin III et al., 2014).

El contenido de COS depende del balance entre las entradas y salidas de carbono en el suelo. Las principales entradas las constituyen los flujos de **hojarasca** del dosel al suelo y el recambio de raíces finas, mientras que las principales salidas ocurren vía la descomposición de la MOS por organismos heterótrofos hasta formas gaseosas de carbono (CH_4 y CO_2), así como por la lixiviación de compuestos orgánicos solubles (Amundson, 2001). Normalmente, la concentración de COS en los bosques es alta en el horizonte más superficial del suelo y disminuye gradualmente conforme la profundidad aumenta, debido a la mayor entrada de residuos orgánicos en la superficie del suelo provenientes de la descomposición del mantillo y el recambio de raíces y microorganismos en la **rizósfera** (Jobbágy y Jackson, 2000).

Los métodos para determinar la concentración del carbono orgánico involucran la oxidación de la materia orgánica de manera seca, vía su combustión con calor, o húmeda, vía su oxidación con una solución (Nelson y Sommers, 1996). Aquí se practicará una modificación del método del ácido crómico para determinar la concentración total de COS a partir de digestión húmeda de la MOS (German et al., 2011).

II. Método

2.1. Principio

El método del ácido crómico o Walkley y Black se basa en la oxidación húmeda del carbono orgánico con una solución de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), más el calor de reacción que se produce al mezclar dicha solución con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Se usa una solución de ácido fosfórico para evitar interferencias del Fe^{3+} en la determinación. La proporción de dicromato que no participó en la oxidación del carbono orgánico es cuantificada mediante el método de **titulación** con una solución de sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Semarnat, 2002). El método del ácido crómico tiene la ventaja de no requerir de equipo muy especializado para su realización, pero tiene la desventaja de que subestima la concentración de carbono total debido a que no oxida los compuestos orgánicos recalcitrantes (Nelson y Sommers, 1996; Semarnat, 2002), y de que usa cromo, el cual es un compuesto químico tóxico que requiere ser tratado con cuidado, así como de un manejo especial en su desecho por compañías que tratan residuos tóxicos. A continuación, se presenta de forma más detallada el principio del método.

La hojarasca es un flujo de residuos de partes de plantas del dosel al suelo, como hojas, tallos y flores. Es preciso no confundir a la hojarasca con el almacén de restos de plantas que yace sobre el suelo, al cual se le denomina mantillo u horizonte "O" del suelo.

La rizósfera es la capa del suelo donde las raíces de las plantas predominan e interactúan con los microorganismos del suelo.

La titulación o valoración ácido-base es un método analítico cuantitativo que permite determinar la concentración desconocida de un reactivo o analito en disolución a partir de una solución de referencia con un reactivo de concentración conocida, denominada titulante. La reacción entre el analito y el titulante tiene una estequiometría conocida que se puede expresar en una ecuación química.

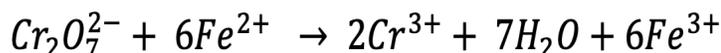
El dicromato de potasio oxida las formas orgánicas de carbono, y libera el carbono en forma de CO_2 . En un medio ácido, esta reacción es exotérmica ($\approx 120\text{ }^\circ\text{C}$) (8.1).



En esta reacción, se asume que la cantidad de dicromato que se reduce es equivalente al contenido de carbono orgánico de la muestra. Asimismo, se asume que las diferentes formas de carbono orgánico, recalcitrantes y lábiles, no tienen un efecto diferencial sobre la reacción y que el potencial de reducción es constante durante la mineralización de la materia orgánica. No obstante, se conoce que la complejidad química de la materia orgánica y su asociación con minerales pueden afectar esta reacción, por lo que para calcular la concentración de carbono orgánico se aplica un factor de corrección, el cual considera que sólo las formas menos complejas y más activas de materia orgánica son oxidadas. Este factor se ha fijado en 1.31, asumiendo que el 76% del carbono orgánico reacciona con el dicromato ($100/76 = 1.31$). No obstante, algunos estudios han mostrado que este factor puede oscilar entre 1.10 y 1.45 dependiendo de la calidad de la materia orgánica (i.e. complejidad química de los compuestos orgánicos) y de la estabilidad física que presenta ésta a partir de su asociación con los minerales del suelo (van Reeuwijk, 1993; German et al., 2011).

El ácido sulfúrico, además de crear un medio ácido y elevar la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción con el dicromato, promueve la disolución de las formas inorgánicas de carbono (i.e. carbonatos, bicarbonatos), de tal forma que el carbono asociado a éstas no interfieran con la medición, excepto en el consumo de ácido y la producción de espuma (Nelson y Sommers, 1996).

El dicromato que no fue consumido en la reacción con el carbono de la materia orgánica es cuantificado mediante titulación a partir de la reducción del dicromato con sulfato ferroso en presencia de un indicador, como se muestra en la siguiente ecuación (8.2).



Para fijar el ion hierro ferroso (Fe^{3+}) que se forma y mejorar el punto de equilibrio en la titulación, se agrega ácido fosfórico (H_2PO_4) o fluoruro de sodio (NaF).

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Vasos de precipitado de 1 L, 500 ml y 250 ml |
| Matraz de Erlenmeyer de 250 ml, uno por muestra |
| Matraz aforado de 1 L |
| Mortero |

| |
|-------------------------------|
| Espátula |
| Pipetas de 5 y 10 ml |
| Piseta con agua destilada |
| Soporte universal |
| Bureta de 50 ml |
| Varilla de vidrio para agitar |
| Equipos |
| Balanza analítica |
| Campana de extracción |
| Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Horno de secado |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|--|
| Agua destilada | N. A. |
| Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (96%) | N. A. |
| Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 0.06667 M (o 0.4 N)* | Disolver 1.96 gr $K_2Cr_2O_7$ (seco a 105° C por 1 h) en 100 ml de agua destilada. Guardar en frasco de color ámbar. |
| Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) 0.2 N** | Disolver 78.3 gr (seco a 60 °C por 2 h) en 800 ml de agua destilada. Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico cuidadosa y lentamente por las paredes del recipiente. Aforar a 1 L con agua destilada y guardar en un frasco color ámbar. |
| Bariosulfonato de difenilamina ($Ba(SO_3C_6H_4NHC_6H_5)_2$) al 0.16% (p/v) (como indicador) | Disolver 0.16 gr de bariosulfonato en 100 ml. Guardar en frasco de color ámbar. |
| Ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado | N. A. |

N. A. = no aplica.

* El dicromato es tóxico por lo que debe manejarse con mucha precaución, y los residuos que contengan este compuesto deben depositarse en un contenedor especial para su adecuada disposición.

** En caso de no contar con sulfato ferroso amoniacal hexahidratado, se puede usar sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.2N. Pesar 55.56 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y seguir el procedimiento descrito.

2.4. Procedimiento

El procedimiento se debe de desarrollar siguiendo consecutivamente los pasos que se describen a continuación

- Seca una muestra de 2 a 4 g de suelo en un horno a 105 °C hasta obtener el peso constante. Este secado debe realizarse un par

de días antes de desarrollar el procedimiento y debes mantener la muestra en un desecador.

- b) Muele la muestra de suelo con un mortero hasta polvo fino; preferentemente tamiza el suelo por un tamiz de 0.25 mm (malla # 60).
- c) Pesa 0.05 g del suelo seco y molido dentro de un matraz de Erlenmeyer de 150 ml. Si crees que el suelo puede tener una concentración de C orgánico alta (>4%) se recomienda usar una menor cantidad de suelo (~0.02 g) y viceversa en caso de que tengas noción de que el suelo pueda tener una concentración de C orgánico baja (<1%), como puede ocurrir en suelos erosionados o en horizontes de suelo profundos, puedes usar una mayor cantidad de muestra (~0.08 g).
- d) Dentro de una campana de extracción, adiciona 5 ml de la solución de dicromato de potasio (0.04 N) en el matraz con la muestra de suelo, y agita suavemente de forma que la muestra no salpique las paredes del matraz.
- e) Dentro de una campana de extracción, adiciona cuidadosamente 10 ml de ácido sulfúrico por las paredes del matraz. Agita ligeramente el matraz durante 1 min para mezclar su contenido, y deja reposar durante 30 min en la campana de extracción.
- f) Una vez fría la solución, añade cuidadosa y lentamente 80 ml de agua desionizada. Este proceso realízalo, también, dentro de una campana de extracción.
- g) Dentro de una campana de extracción, añade 5 ml de ácido fosfórico concentrado, agitando el matraz suavemente para homogeneizar.
- h) Añade 10 gotas del indicador bariosulfonato de difenilamina. La solución tomará un color que puede variar entre naranja a un verde opaco.
- i) Simultáneamente a la preparación de la muestra, prepara un blanco. Éste contendrá los mismos reactivos que se le agregaron a las muestras problemas con la diferencia que no contendrán la muestra de suelo, sólo reactivos.
- j) Titula las muestras con sulfato ferroso amoniacal 0.2 N. Añade el titulante gota por gota; notarás que la solución toma un color púrpura conforme se agrega el sulfato, para posteriormente virar a un color verde esmeralda, momento en el cual debes detener la titulación (Figura 8.1). Toma la lectura del volumen de sulfato en la bureta y calcula el volumen usado en la titulación. Este dato lo usarás en la determinación de la concentración de carbono de la muestra. Cuando la cantidad de materia orgánica es superior a la que el dicromato puede oxidar, la solución se torna verdosa desde que se agrega el dicromato o se gasta menos de 1 ml de sulfato ferroso al titular. Cuando la muestra no vira de color naranja o verde opaco a verde esmeralda hubo un problema en el procedimiento. En estos casos se deberá repetir el procedimiento con una menor cantidad de suelo, o bien, siguiendo los pasos sin cambiar su orden.

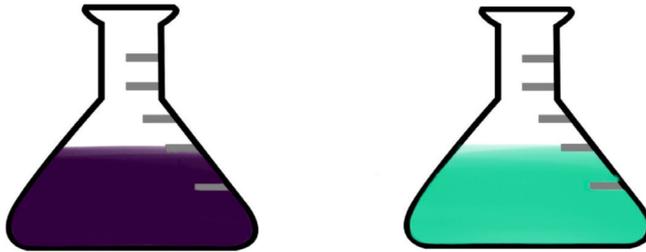


Figura 8.1. Coloraciones que adquiere la muestra problema durante la titulación para determinar la concentración de carbono orgánico del suelo por el método de Walkley y Black. Izquierda, color púrpura de la muestra durante de la titulación. Derecha, color verde esmeralda que toma la muestra al término de la titulación.

III. Cálculos

La concentración de carbono orgánico total de la muestra de suelo se calcula con la siguiente ecuación (8.3) (Semarnat, 2002):

$$C_{\text{orgánico}} = \frac{(V_1 - V_2) * N * 0.39}{S}$$

Donde:

$C_{\text{orgánico}}$ = concentración de carbono orgánico (%)

V_1 = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco (ml)

V_2 = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

S = peso seco de la muestra de suelo (g)

N = normalidad del sulfato ferroso (0.2 N)

0.39 = resulta de la siguiente ecuación: $(12 / 4000) * (1 / 0.77) * (100) = 0.39$; donde: $12 / 4000$ es el peso miliequivalente del carbono; $1 / 0.77$ es el factor de corrección, que considera el supuesto que el método oxida en promedio el 77% del C orgánico; se multiplica por 100 para convertir a porcentaje.

Para transformar la concentración de C orgánico a concentración de materia orgánica (MO) se multiplica el valor de COS por un factor de 2. Este factor asume que la concentración de carbono en la materia orgánica es de 50%; por lo tanto, $1 / 0.5 = 2$ (van Reeuwijk, 1993).

El almacén de carbono en el suelo se expresa en términos de contenido, normalmente en kg C/km² o Mg C/ha. Para el cálculo del almacén de C en el suelo se requieren datos de concentración de carbono y densidad aparente del suelo, como se observa en la siguiente ecuación (8.4) (Amundson, 2001):

$$C_{\text{contenido}} = C_{\text{orgánico}} * DA * Pr_{\text{suelo}} * 10,000 \text{ m}^2/1\text{ha}$$

Donde:

- $C_{\text{contenido}}$ = contenido de carbono orgánico (Mg C/ha)
- $C_{\text{orgánico}}$ = concentración de carbono orgánico en fracción (%/100)
- DA = densidad aparente (Mg/m³)
- Pr_{suelo} = profundidad del suelo (m)
- 10,000 m²/1 ha = conversión espacial de m² a hectáreas (10,000 m²/ha)
- 1 Mg = 1 tonelada = 1000 kg

Por ejemplo: a 30 cm de profundidad, un suelo con 2% de C orgánico y una densidad de 1 Mg/m³, tiene un almacén de: 0.02 x 1 Mg/m³ x 0.3 m x 10,000 m²/ha = 60 Mg C/ha.

Aunque el almacén de carbono representa una cantidad de carbono en un volumen de suelo, éste se expresa en unidades de masa/área. Por lo tanto, cuando se reporta el almacén de C se debe indicar la profundidad de la capa de suelo a la que pertenece, por ejemplo: 60 Mg C/ha a una profundidad de 30 cm del suelo.

IV. Interpretación

La MOS juega un papel importante en una variedad de propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo. Conforme aumenta la concentración de MOS en un suelo, normalmente aumenta la capacidad de intercambio catiónico, la formación de agregados estables, el contenido total de N, la capacidad de retención de agua y la actividad microbiana (Brady y Weil, 2013; Binkley y Fisher, 2012). Así, en estudios de largo plazo, el patrón anual de la MOS puede indicar si la calidad del suelo está mejorando o disminuyendo (Lima et al., 2013). Por otro lado, a medida que aumenta la MOS, el suelo aumenta su capacidad de adsorber diversos herbicidas aplicados en la agricultura, reduciendo la efectividad de estos (Brady y Weil, 2013).

En la Tabla 8.1 se presenta una interpretación general de la concentración del carbono orgánico del suelo con relación a propiedades físicas y químicas de los suelos.

Tabla 8.1. Relación entre la concentración de carbono orgánico del suelo (COS) y diferentes propiedades físicas y químicas de los suelos

| COS (%) | Categoría | Interpretación |
|-----------|---------------------|---|
| <0.40 | Extremadamente baja | Condición estructural muy pobre. Superficie del suelo altamente degradada. Subsuelo o suelo altamente erosionado. |
| 0.40-0.59 | Muy baja | Condición estructural muy pobre. Estabilidad estructural (de agregados) muy baja. |
| 0.60-0.79 | Baja, B1 | Condición estructural de pobre a moderada. Estabilidad de pobre a moderada. |
| 0.8-0.99 | Baja, B2 | |

| | | |
|----------|-----------------------------|---|
| 1.0-1.19 | Moderada, M1 | Las siguientes propiedades mejoran conforme incrementa la concentración de carbono: estabilidad estructural, capacidad buffer de pH, nivel nutricional del suelo (especialmente nitrógeno), capacidad de retención de agua. |
| 1.2-1.39 | Moderada, M2 | |
| 1.4-1.59 | Moderada, M3 | |
| 1.6-1.79 | Alta, A1 | Buena condición estructural, alta estabilidad estructural, capacidad buffer del pH, niveles de nutrientes del suelo buenos (especialmente nitrógeno) |
| 1.8-1.99 | Alta, A2 | |
| 2.0-2.19 | Muy alta, MA1 | Suelos con muy buena estructura y alta capacidad para amortiguar cambios de pH, con suficiente materia orgánica para disminuir la densidad aparente y mejorar la capacidad de retención de humedad. |
| 2.2-2.39 | Muy alta, MA2 | |
| 2.4-2.59 | Muy alta, MA3 | |
| 2.6-2.99 | Muy alta, MA4 | |
| 3.0-8.70 | Extremadamente alta | Suelos de color oscuro, graso al tacto y con una evidente cantidad de materia orgánica. Usualmente asociado con áreas boscosas. |
| >8.7 | Material orgánico del suelo | Suelos con una alta cantidad de materia orgánica, incluyendo turba. |

Fuente: modificado de Hazelton y Murphy, 2007.

V. Autoevaluación

1. ¿Por qué la concentración de carbono orgánico del suelo se relaciona directamente con la concentración de materia orgánica?
2. ¿Qué es la materia orgánica del suelo?
3. ¿Qué funciones desempeña la materia orgánica en el suelo?
4. ¿En qué horizonte del suelo mineral normalmente se concentra la mayor cantidad de materia orgánica y por qué?
5. ¿En qué consiste el método analítico de titulación?
6. Calcula la concentración y el contenido de carbono para cada caso que se presenta en la siguiente tabla. Considera los siguientes datos para determinar la concentración: gasto de sulfato ferroso del blanco = 18 ml, normalidad del sulfato ferroso 0.2 N, peso seco de suelo 0.05 g. Para determinar el contenido supón que la capa de suelo es de 30 cm.

| Gasto de sulfato ferroso de la muestra (ml) | Concentración de carbono (mg C/g) | Densidad del suelo (Mg/m ³) | Contenido (Kg C/m ²) |
|---|-----------------------------------|---|----------------------------------|
| 9 | | 0.95 | |
| 2 | | 0.75 | |
| 5 | | 0.88 | |

Capacidad de intercambio catiónico



Carlos Antonio Anaya Merchant
Neftalí Razo Pérez

En este capítulo se espera que el estudiante comprenda qué es la capacidad de intercambio catiónico del suelo, qué partículas inorgánicas y orgánicas del suelo la determinan, cuál es su importancia, y que aprenda un método para determinarla.

I. Introducción

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) ha sido definida de dos formas, como la capacidad del suelo para retener e intercambiar cationes (e.g. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ , Na^+ , Al^{3+} , NH_4^+) y como la suma del total de **cationes intercambiables** que un suelo puede adsorber (Summer y Miller, 1996). Esta propiedad del suelo reside en las cargas negativas que tienen los **coloides** del suelo (e.g., **arcillas**, materia orgánica y óxidos de aluminio y hierro), la cual produce una fuerza electrostática que atrae a los cationes y permite que se adhieran o adsorban a sus superficies (Brady y Weil, 2013). La CIC es un proceso reversible, de tal forma que hay un intercambio continuo de cationes entre los coloides y la solución del suelo.

La CIC juega un papel importante en diversos procesos de los suelos, incluyendo la retención y disponibilidad de nutrientes, el amortiguamiento de los cambios del pH, la formación y estabilidad de los agregados del suelo, la retención de agua y las respuestas a los fertilizantes, pesticidas y contaminantes (Tan, 2010). Una CIC baja puede estar asociada a un reducido poder de amortiguamiento a cambios en el pH, baja capacidad de retener nutrientes y una pobre estructura (Hazelton y Murphy, 2007).

La carga negativa de los coloides del suelo deriva de cambios en la composición química de éstos que no afectan su estructura, principalmente por el remplazo de elementos químicos de similar tamaño en los minerales de arcilla, llamados sustituciones isomórficas; así como por disociación de grupos hidroxilo expuestos en la superficie de los minerales y de la materia orgánica (Tan, 2010). Se sugiere que la sustitución isomórfica es una fuente importante de cargas negativas en arcillas de capa 2:1 (i.e. arcillas con una capa de octaedros de aluminio, entre dos capas de tetraedros de silicio). En éstas, algunos elementos de Al^{3+} de la capa de octaedros son sustituidos por Mg^{2+} , y algunos elementos de Si^{4+} de las capas de tetraedros son sustituidos por otro elemento, generalmente Al^{3+} , dejando a la arcilla con cargas negativas. La carga

Los cationes intercambiables se mantienen sobre o cerca de la superficie de un coloide del suelo por atracción de cargas de signo opuesto, y pueden ser reemplazados por otros iones de la solución del suelo con carga similar.

Los coloides pueden ser orgánicos o inorgánicos y se caracterizan por tener un tamaño pequeño (entre 1nm y 1 μm), alta superficie específica y una carga neta negativa o positiva en su superficie.

negativa resultante se considera una carga permanente, debido a que no es afectada por cambios en el pH (Tan, 2010). La disociación de iones H^+ de grupos hidroxilo (OH^*) en las superficies de los minerales deja a estas superficies con la carga negativa de los iones de oxígeno. Esta disociación es afectada por el pH, a pH alto los iones de hidrógeno tienden a disociarse, por lo que la carga que se genera a través de este fenómeno se le conoce como carga variable o carga dependiente del pH. Se sugiere que este tipo de carga es importante en arcillas de capa 1:1 (i.e. arcillas con una capa de octaedros de aluminio y una capa de tetraedros de silicio), óxidos de hierro y aluminio, y en coloides orgánicos del suelo (Tan, 2010). En los coloides orgánicos, como el humus, las cargas negativas son atribuidas a la disociación de grupos hidroxilo que presentan algunos grupos funcionales orgánicos, principalmente los grupos carboxilo ($COOH$) y fenólico (OH) (Tan, 2010).

De acuerdo con lo anterior, la CIC también es una medida de la cantidad de cargas negativas que tiene un suelo, y como tal se expresa en unidades de centimoles de carga positiva por kg de suelo ($cmol(+)/kg$) o en unidad de miliequivalentes por 100 g suelo ($me / 100 g$) (Sumner y Miller, 1996). La CIC en los suelos varía en un intervalo que va desde menos de 1 a más de 100 ($cmol(+)/kg$). Entre las propiedades de los suelos que afectan su CIC se incluyen la textura, tipos de arcillas, concentración de materia orgánica y su pH (Osman, 2013). Los tipos de arcillas difieren en su CIC dependiendo de su tamaño, composición y estructura (Brady y Weil, 2013). Por ejemplo, las arcillas 1:1 (e.g. caolinita) tienen una menor CIC que las arcillas 2:1 (e.g. mica y montmorillonita); y entre estas últimas, las arcillas que no se expanden (e.g. mica) tienen una menor CIC que las arcillas expandibles (e.g. montmorillonita). Así, las CIC de la caolinita, mica y montmorillonita oscilan dentro de los siguientes intervalos: 3-10, 15-20 y 80-120 $cmol(+)/kg$, respectivamente (Brady y Weil, 2013). Por otro lado, la CIC normalmente incrementa conforme aumenta la proporción de arcillas y la concentración de materia orgánica en un suelo (Osman, 2013).

Se han desarrollado diversos métodos para medir la CIC, cada uno con sus particularidades y con resultados que se prestan para diferentes interpretaciones (Bergaya et al., 2006; Soil Survey Staff, 2014; Sumner y Miller, 1996). Uno de los métodos más comunes consiste en aplicar una solución salina saturada al suelo con un catión índice que desplaza a los cationes intercambiables y satura las superficies de intercambio del suelo. Posteriormente el catión índice es extraído con un volumen conocido de una solución salina y cuantificado. La cantidad de este catión índice es usada para determinar la CIC. Los métodos que usan este procedimiento varían en cuanto al catión índice que usan y en cuanto al control que ejercen sobre el pH (i.e. métodos con y sin amortiguamiento de pH). Los métodos con amortiguamiento normalmente son usados con fines comparativos y de clasificación de suelos, mientras que los métodos sin amortiguamiento de pH son usados para el estudio de procesos en condiciones de campo (Soil Survey Staff, 2014; Sumner y Miller, 1996). Otro método común para estimar la CIC consiste en extraer los cationes

Las arcillas expandibles se caracterizan porque al humedecerse aumentan su tamaño y al secarse se contraen. Los suelos con estas arcillas suelen presentar abundantes grietas durante la temporada de estiaje.

intercambiables del suelo con una solución salina y cuantificar sus concentraciones en los extractos. A partir de la suma de los cationes intercambiables (considerando: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Al^{3+}) se estima la CIC (Robertson et al., 1999). Aquí se presenta un método no amortiguado para determinar la CIC.

II. Método

2.1. Principio

El método para medir la CIC que se describe aquí está basado en Sumner y Miller (1996). Este método usa una solución salina no amortiguada por lo que mide la CIC al pH que tiene el suelo, y es recomendado para los casos en que se quiere describir procesos en condiciones semejantes a las que ocurren en campo (Sumner y Miller, 1996). El método consiste en sustituir los cationes intercambiables y saturar las superficies de intercambio con un catión índice que se adhiere a ellas. Posteriormente, este catión índice es extraído con una solución salina y cuantificado. La cantidad del catión índice en la solución extractante es usada para determinar la CIC. Como catión índice se usa amonio (NH_4^+), el cual es suministrado a través de una solución no amortiguada de cloruro de amonio (NH_4Cl). Se usa amonio, en vez de otros cationes, debido a que normalmente presenta una baja concentración en los suelos, a que no se precipita al entrar en contacto con el suelo y a que es relativamente fácil de determinar. Como solución extractante se usa una solución concentrada de nitrato de potasio (KNO_3).

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Vaso de precipitado de 250 ml |
| Matraz de Erlenmeyer de 250 ml, dos por muestra |
| Matraz para aforar de 1L (dos) |
| Espátula |
| Piseta con agua destilada |
| Tubos para centrífuga de 50 ml con tapa |
| Pipetas de 10-50 ml. |
| Equipos |
| Balanza analítica |
| Agitador vortex |
| Centrífuga para tubos de 50 ml |
| Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Horno de secado |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|---|
| Agua desionizada | N. A. |
| Cloruro de amonio (NH_4Cl), 0.2M. | Disolver 10.7 g de NH_4Cl puro en 1 L de agua desionizada |
| Nitrato de potasio (KNO_3), 0.2 M | Disolver 20.2 g de KNO_3 puro en 1 L de agua desionizada |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

- a) Determina la humedad del suelo por gravimetría siguiendo el método descrito en el capítulo 5. Si observas que el suelo tiene una humedad alta, sécalo al aire por 24 a 48 h antes de determinar la humedad.
- b) Tamiza una muestra de suelo (>40 g) por un tamiz de 2 mm para obtener la fracción fina del suelo.
- c) Toma una muestra de suelo tamizado y fresco equivalente a una masa de 5 g de suelo seco, y colócala dentro de un tubo de centrifuga previamente pesado.
- d) Agrega 30 ml de NH_4Cl 0.2M y agita por 5 min con los tubos en posición horizontal.
- e) Centrifuga a 2,500 rpm por 3 min y decanta el sobrenadante en un matraz de 250 ml, ten cuidado para evitar pérdidas de suelo.
- f) Agrega 30 ml de NH_4Cl 0.2M, suspende todo el suelo con el uso del vortex y agita por 5 min. Centrifuga a 2,500 rpm por 3 min y decanta el sobrenadante en el matraz de 250 ml. Repite este proceso tres veces más.
- g) Lava el suelo con agua desionizada para eliminar el amonio de la solución del suelo. Para ello agrega 30 ml de agua desionizada, suspende el suelo con el vortex, agita por 5 min, centrifuga y decanta el sobrenadante para su posterior eliminación. Repite este proceso tres veces más.
- h) Remueve el amonio de las superficies de intercambio con KNO_3 . Agrega 30 ml de KNO_3 0.2 M, suspende todo el suelo con el vortex, agita por 5 min, centrifuga y colecta el sobrenadante en un matraz de 250 ml.
- i) Repite el proceso anterior cuatro veces más, juntando el sobrenadante en el mismo matraz de 250 ml.
- j) Determina la concentración de amonio en el extracto. Para esto usa el método para determinar amonio que se presenta en el capítulo 10. Es importante mencionar que la concentración de amonio de estas muestras puede ser alta por lo que deben de diluirse antes de realizar las mediciones. Se sugiere que realices pruebas con diferentes diluciones antes de aplicar el método para determinar amonio.

III. Cálculos

Para calcular la CIC se usa la siguiente ecuación (9.1) (Sumner y Miller, 1996):

$$CIC = \frac{NH_4^+ * M}{18}$$

Donde:

CIC = capacidad de intercambio catiónico, en centimoles de cargas positivas por kilogramo de suelo (cmol(+)/kg).

NH_4^+ = concentración de NH_4^+ en los extractos de KNO_3 en miligramos por litro.

M = masa del suelo en gramos.

El símbolo “+” en las unidades (cmol(+)/kg) indica que la CIC es expresada en moles de cationes monovalentes equivalentes (Semarnat, 2002).

IV. Interpretación

La CIC normalmente se relaciona positivamente con la fertilidad de los suelos, ya que conforme aumenta la CIC, el suelo puede retener e intercambiar más cationes (i.e. nutrientes) con la solución del suelo (Brady y Weil, 2013). En este contexto, en la Tabla 9.1 se presenta una clasificación genérica de la CIC con base en su efecto sobre la fertilidad de los suelos.

La CIC está positivamente relacionada con la capacidad del suelo para amortiguar cambios del pH, generalmente conforme aumenta la CIC los suelos adquieren una mayor capacidad para amortiguar cambios en el pH de la solución del suelo, esto debido a que a mayor CIC, mayor capacidad de adsorber cationes de la solución del suelo, incluyendo a los cationes ácidos (H^+ , Al^{3+}) (Sims, 1996).

La CIC es fuertemente afectada por la superficie específica de los suelos y la carga superficial de los coloides; es decir la CIC depende de la textura del suelo, de los tipos de arcillas y de la concentración de la materia orgánica. En general, los suelos franco arenosos tienen una CIC menor a 10 cmol(+)/kg, los francos y franco-limosos tienen una CIC entre 10 y 20 cmol(+)/kg, y los franco-arcillosos tienen una CIC mayor de 20 cmol(+)/kg (Sikora et al., 2014). El contenido de materia orgánica también tiene una fuerte influencia en el CIC del suelo, ya que los coloides orgánicos tienen una CIC mayor en comparación con los minerales de arcilla (Brady y Weil, 2013). Asimismo, dada la influencia de la textura y el tipo de arcillas sobre la CIC, se usa como un criterio diagnóstico en la clasificación de suelos; por ejemplo, los horizontes ferrálicos (lat. *ferrum*, hierro) se caracterizan por tener una CIC menor a 16 cmol(+)/kg de arcilla; los horizontes árgicos (lat. *argilla*, arcilla blanca) tienen una CIC menor a 24 cmol(+)/kg de arcilla; y los horizontes níticos (lat. *nitidus*, brillante) se caracterizan por tener una cantidad significativa de hierro activo y una CIC menor a 36 cmol(+)/kg de arcilla (IUSS, 2007).

Tabla 9.1. Clasificación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de los suelos de acuerdo con su fertilidad

| Categoría | CIC (cmol(+)/kg) |
|-----------|------------------|
| Muy bajo | <6* |
| Bajo | 6-12 |
| Moderado | 12-25 |
| Alto | 25-40 |
| Muy alto | >40 |

* Suelos con un valor de CIC menor a tres suelen presentar deficiencias de nutrientes y ser susceptibles a la acidificación.

Fuentes: Hazelton y Murphy, 2007; Semarnat, 2002.

V. Autoevaluación

1. ¿Qué es la capacidad de intercambio catiónico de un suelo?
2. Menciona tres características de los coloides del suelo y da dos ejemplos de estos.
3. Menciona tres procesos edáficos que pueden ser afectados por la capacidad de intercambio catiónico.
4. ¿A qué se deben o cómo se originan las cargas negativas en las arcillas y en los compuestos orgánicos del suelo?
5. ¿Por qué algunos coloides tienen una carga negativa permanente y otros tienen una carga negativa variable?
6. Con el método que se explica aquí se puede saber la cantidad de cationes que está reteniendo el suelo (i.e. porcentaje de saturación de cationes), ¿sí, no, por qué?

Amonio y nitrato

Carlos Antonio Anaya Merchant
Neftalí Razo Pérez

10

En este capítulo se espera que el alumno reconozca la importancia del amonio y nitrato en el suelo y aprenda a determinar las concentraciones de estos compuestos por espectrofotometría.

I. Introducción

El nitrógeno (N) es un componente de diversas biomoléculas que intervienen en el metabolismo y la división celular, tales como los aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, por lo que su disponibilidad en el suelo puede determinar el crecimiento de las plantas y los microorganismos; así como el funcionamiento de los ecosistemas (Chapin III et al., 2014). Este elemento es considerado un **macronutriente** debido a que es requerido por los seres vivos en, relativamente, grandes cantidades.

El ciclo del N se caracteriza por presentar formas moleculares gaseosas y no gaseosas que intervienen en diferentes procesos biogeoquímicos debido a su reactividad química, fotoquímica y bioquímica (Galloway y Cowling, 2002; Townsend et al., 2003). El nitrógeno es el principal constituyente de la atmósfera, representando el 78% de ésta en forma de dinitrógeno (N_2). El dinitrógeno tiene la peculiaridad de ser muy estable e inerte, por lo que no puede ser usado por la mayoría de los organismos vivos, con excepción de algunas bacterias simbióticas y de vida libre que lo pueden transformar a una forma reactiva a través del proceso conocido como fijación biológica del N. Una vez que el N ha sido fijado biológica o físicamente (p. ej. a través de una descarga eléctrica) en una forma química reactiva (e.g. amonio (NH_4^+)), éste puede ser reciclado a través de la red trófica (Chapin III et al., 2014). En el suelo, el N se encuentra en forma orgánica e inorgánica, y dependiendo de estas formas, puede circular por alguna vía de su ciclo. De forma orgánica es constituyente de materia orgánica particulada y de compuestos orgánicos de diferentes tamaños (e.g. aminoácidos, proteínas, y compuestos humificados), mientras que de manera inorgánica se encuentra principalmente en forma de amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) o nitrito (NO_2^-). En general, el N-orgánico no está disponible para las plantas con la excepción de compuestos orgánicos nitrogenados pequeños (e.g. aminoácidos) cuya absorción se ha documentado en algunas especies o grupos de plantas de climas fríos (Lavelle y Spain, 2001; Chapin III et al., 2014; Hirsch, 2019). En cambio, el amonio y el nitrato son consideradas las principales formas disponibles de nitrógeno en el suelo (Chapin III et al., 2014).

La estabilidad del dinitrógeno se debe a que la molécula presenta un enlace covalente triple entre los dos átomos de nitrógeno que la conforman.

El nitrógeno también es fijado de manera industrial para la producción de fertilizantes nitrogenados a través del proceso Haber-Bosch, que consiste en la formación de dos moléculas de amoniaco combinando una molécula de nitrógeno y tres de hidrógeno a 500 °C y 200 atmósferas de presión.

Las concentraciones de amonio y nitrato en el suelo dependen del balance entre las entradas y salidas de estas moléculas a la solución del suelo. Las principales entradas las constituyen el depósito húmedo de compuestos nitrogenados inorgánicos a través de la precipitación pluvial y la **mineralización** de compuestos orgánicos nitrogenados a amonio (i.e. amonificación) y la transformación de amonio a nitrato (i.e. nitrificación). Las salidas principales comprenden la absorción por las plantas y los microorganismos, las pérdidas por lixiviación y las emisiones de dinitrógeno y óxidos de nitrógeno durante el proceso de **desnitrificación** (i.e. transformación del nitrato a dinitrógeno) (Likens, 2012).

El estudio de las concentraciones de nitrógeno inorgánico en el suelo permite analizar la disponibilidad de este elemento en el suelo y los procesos que intervienen en la dinámica temporal y espacial del mismo (Horneck et al., 2011). Existen diversos métodos para determinar las concentraciones de amonio y nitrato en suelos (ver Mulvaney, 1996), siendo los métodos espectrofotométricos unos de los más usados. En la presente práctica se emplearán los métodos descritos por Mulvaney (1996) y Sims y Jackson (1971) para amonio y nitrato, respectivamente.

II. Método

2.1. Principio

En primera instancia se extraen el amonio y el nitrato del suelo con el uso de una solución salina. Posteriormente, los extractos son filtrados para ser analizados por espectrofotometría. Este método permite determinar la concentración de un analito en una solución acuosa problema mediante la generación de color en la muestra por la reacción del analito con otra sustancia, y la posterior medición de la absorbancia de cierta longitud de onda por esta muestra con el uso de un espectrofotómetro. Así, el amonio (NH_4^+) es determinado midiendo la **absorbancia** de longitud de onda de 667 nm de una muestra problema, teñida de color verde esmeralda a través de un tratamiento con hipoclorito y salicilato. El mecanismo para generar el color consiste en tres pasos: primero el amonio reacciona con el hipoclorito para formar monocloramina; después, la monocloramina reacciona con el salicilato para formar benzoquinona-monoimino; finalmente, esta última sustancia se acopla con el salicilato y forma indofenol, el cual es una sustancia con color. Se usa un agente quelante (EDTA) para precipitar los cationes divalentes y trivalentes, como hidróxidos, y que estos no interfieran con la medición. También se agrega nitroprusiato de sodio como catalizador, además de un baño maría a 37 °C, para incrementar la tasa e intensidad del color (Mulvaney, 1996). Por su parte, la determinación del nitrato se realiza midiendo la absorbancia de longitud de onda de 430 nm de una muestra problema, previamente teñida de color amarillo a través de la formación de un complejo químico producido en la reacción del nitrato con el

Los espectrómetros miden la cantidad de luz que llega desde una fuente hasta un receptor después de haber atravesado una solución problema. Así, estos equipos pueden medir la transmitancia (i.e. la cantidad de luz que atraviesa la sustancia) y la absorbancia (i.e. la cantidad de luz que es absorbida por la sustancia) de la solución.

ácido cromotrófico (Sims y Jackson, 1971). En ambos casos la absorbancia de luz y la intensidad del color se relacionan directamente con la concentración de los compuestos de nitrógeno.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|--|
| Vasos de plástico de boca ancha de 100 ml con tapa. |
| Matraz de Erlenmeyer de 50 ml, (1 por muestra y 5 para curva de calibración) |
| Matraces aforados de 1 L y 100 ml |
| Espátula |
| Pipeta de 5 ml |
| Piseta con agua destilada |
| Embudos de 50 ml |
| Papel filtro Whatman No. 42 |
| Soprote para embudos |
| Equipos |
| Balanza analítica |
| Agitador recíproco |
| Espectrofotómetro de luz visible con celdas para muestras. |
| Baño maría |
| Tamiz de 2 mm de amplitud de malla |
| Horno de secado |

2.3. Reactivos para determinación de amonio

| Reactivo | Preparación |
|---|--|
| Agua desionizada | N. A. |
| Cloruro de potasio (KCl) 2M | Disolver 149.6 g de KCl puro en 1 L de agua desionizada. |
| Nitroprusiato de sodio (disodio pentacianonitrosilferrato, $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | 0.125 g de nitroprusiato de sodio en 80 ml de agua desionizada. |
| Salicilato de sodio ($\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) | N. A. |
| Nitroprusiato de salicilato de sodio | Disolver 7.813 g de salicilato de sodio ($\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) en el nitroprusiato de sodio y aforar a 100 ml. Colocar en un bote color ámbar para protegerlo de la luz, y almacenar en refrigeración. |
| Hidróxido de sodio (NaOH) | N. A. |

| | |
|---|---|
| Fosfato de sodio monohidrogenado heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | N. A. |
| Hipoclorito de sodio (NaOCl) (Cloro comercial) | N. A. |
| Buffer de hipoclorito (NaOCl) | Disolver 2.96 g de hidróxido de sodio (NaOH), y 9.96 g de fosfato de sodio monohidrogenado en 60 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar 10 ml de una solución de hipoclorito de sodio. Ajustar a un pH 13 con NaOH, y aforar a 100 ml con agua desionizada. |
| Ácido etilendiaminotetraacético (Na_2EDTA) | Disolver 6 g de Na_2EDTA en 100 ml de agua. |
| Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (solución estándar de $2 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N / ml}$) | Disolver 0.0943 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 200 ml de agua destilada. Si el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es puro, la solución contiene $100 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N / ml}$. Posteriormente diluye 4 ml de esta solución a 200 ml en un matraz aforado con agua. |

N. A. = no aplica.

2.4. Reactivos para determinación de nitrato

| Reactivo | Preparación |
|---|---|
| Agua destilada | N. A. |
| Hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) al 0.2% (p/v). | Disolver 2 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en 1 L de agua desionizada. |
| Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (96%) | N. A. |
| Ácido cromotrófico disodio (ACT) al 0.1%. | Disolver 0.184 g de ACT en 100 ml de ácido sulfúrico. Esta solución es estable por dos semanas manteniéndose en condición de oscuridad. |
| Ácido clorhídrico (HCl) concentrado | N. A. |
| Ácido cromotrófico disodio ACT al 0.01% (solución de trabajo) | Disolver 100 ml de la solución de ACT 0.1% en 10 ml de HCl concentrado, y aforar a 1 L con H_2SO_4 concentrado. |
| Solución estándar de nitrato ($50 \mu\text{g NO}_3\text{-N / ml}$) | Disolver 0.1804 g de KNO_3 en 500 ml de agua destilada. Si se usa un reactivo puro, la solución tendrá $50 \mu\text{g NO}_3\text{-N / ml}$. |
| Soluciones estándar de nitrato de 2, 4, 6, 10 y 20 $\mu\text{g NO}_3\text{-N / ml}$ | Diluir 2, 4, 6, 10 y 20 ml de la solución estándar concentrada de nitrato en matraces aforados de 50 ml con agua destilada. |

N. A. = no aplica.

Las notaciones $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$, significan que se hace referencia al N del amonio y N del nitrato, y no al amonio y al nitrato per se. Una de las razones para expresar las concentraciones así, es que se usa al N elemental como una sola "moneda de cambio" para las diferentes formas inorgánicas (y orgánicas) de este elemento. De tal forma que se pueden sumar las concentraciones de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$, sin necesidad de hacer conversiones, para estimar la concentración de N inorgánico del suelo.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Extracción de amonio y nitrato

En primera instancia se extrae el amonio y el nitrato de la solución del suelo con sus respectivos extractantes:

- Pesa dos submuestras de suelo de 10 g y pon cada una en vasos de plástico de 100 ml.
- A un vaso adiciona 50 ml de cloruro de potasio 2M para extraer el amonio y al otro 50 ml de hidróxido de calcio al 0.2% para extraer el nitrato.
- Sacude los vasos en un agitador recíproco por 1 h. Permite que la suspensión se sedimente hasta que el sobrenadante se aclare, normalmente sucede a los 15 min, y filtra a través de un papel Whatman No. 42.

2.5.2. Determinación de amonio por espectrofotometría

- Pipetea una alícuota de 3 ml del **extracto de suelo** dentro de un matraz volumétrico de 25 ml; agregar 1 ml del reactivo EDTA y mezclar el contenido moviendo suavemente el matraz horizontalmente.
- Agrega a la solución 4 ml del nitroprusiato-salicilato de sodio, mueve suavemente el matraz para mezclar, y lleva el volumen a aproximadamente 20 ml con agua desionizada.
- Agrega 2 ml del buffer de hipoclorito, mezcla bien el contenido, y afora con agua a 25 ml. Finalmente, pon el matraz en baño maría a 37 °C por 30 min para desarrollar el color.
- Retira el matraz del baño, permite que la solución se enfríe a temperatura ambiente, y mide su absorbancia a una $\lambda=667$ nm en un espectrofotómetro.
- En paralelo con el procesamiento de las muestras, debes procesar dos blancos. Cada blanco se procesa igual que una muestra problema, con excepción de que éstos se preparan con 3 ml de la solución extractante de KCL, en vez de extractos de suelo.
- Para estimar la concentración de amonio a partir de los datos de absorbancia debes generar una curva de calibración. Esta curva se realiza con soluciones de estándares que contienen 0, 2, 4, 6, 10 y 20 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N}$. Para ello, en seis matraces volumétricos de 25 ml pon en cada uno 3 ml del extractante de KCl, y agrega 0, 1, 2, 3, 5 y 10 ml de la solución estándar de amonio que contiene 2 μg de $\text{NH}_4^+\text{-N ml}^{-1}$. Posteriormente lleva a cabo el desarrollo del color y mide la absorbancia de acuerdo como se describió arriba para los extractos de suelo (pasos b al d). Finalmente, genera un modelo de regresión lineal ($y=mx+b$) con base en los datos de concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y absorbancia, considerando la absorbancia como la variable independiente "X" y la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ como la variable dependiente "Y".

2.5.3. Determinación por colorimetría de nitrato

- Pipetea una alícuota de 3 ml del extracto de nitrato dentro de un matraz volumétrico de 25 ml. Adiciona cuidadosamente y por goteo 7 ml de ACT al 0.01%, y deja enfriar a temperatura ambiente por 30 min para que se desarrolle el color.
- Determina la absorbancia de la solución a una $\lambda=430$ nm.
- En paralelo con el procesamiento de las muestras, se deben procesar dos blancos. Cada blanco se procesa igual que una muestra problema, con excepción de que estos se preparan con 3 ml de la solución extractante, en vez de un extracto de suelo. Los blancos permiten evaluar el grado en que las muestras se contaminan con nitrato durante su procesamiento.
- Para estimar la concentración de nitrato a partir de los datos de absorbancia debes generar una curva de calibración. Esta curva se realiza con soluciones estándares que contienen 0, 2, 6, 10 y 20 $\mu\text{g NO}_3\text{-N}$. Para ello, dentro de seis matraces volumétricos de 25 ml pipetea 2 ml de la solución extractante de hidróxido de calcio, posteriormente pon 1 ml de las diluciones estándar de nitratos de 0, 2, 4, 6, 10 y 20 $\mu\text{g NO}_3\text{-N/ml}$. Posteriormente lleva a cabo el desarrollo del color y la medición de la absorbancia de cada solución de acuerdo como se describe arriba para los extractos de suelo (pasos a y b).
- Finalmente, genera un modelo de regresión lineal ($y=mx+b$) con base en los datos de concentración de $\text{NO}_3\text{-}$ y absorbancia, considerando esta última como la variable independiente "X" y la concentración de nitrato como la variable dependiente "Y".

III. Cálculos

En primera instancia se determina la concentración de amonio y nitrato de los extractos. Para ello, usa los modelos de regresión lineal generados con las curvas de calibración (relación concentración vs absorbancia), donde el valor de la variable independiente "X", corresponde a la absorbancia registrada en la muestra problema. Una vez obtenidos los valores de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ o $\text{NO}_3\text{-N}$ en μg , aplica la siguiente ecuación para calcular la concentración por unidad de masa de suelo (10.1):

$$\text{NH}_4^+ - \text{N} = \left(\frac{(\text{NH}_4^+ m - \text{NH}_4^+ \text{Bco})}{V_m} \right) E/S$$

Donde:

- $\text{NH}_4^+\text{-N}$ = concentración de amonio ($\mu\text{g} / \text{g}$ suelo)
- $\text{NH}_4^+_{\text{muestra}}$ = concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ de la muestra (μg)
- $\text{NH}_4^+_{\text{Bco}}$ = concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ del blanco (μg)
- V_m = volumen de muestra usado en el análisis (3 ml)
- E = volumen total de extractante (50 ml)
- S = peso seco del suelo (g)

Dado que para la determinación de estas formas inorgánicas de N se usa suelo fresco, es necesario hacer una corrección por la humedad que tiene el suelo, para determinar el peso seco que se usa en la ecuación. Para esto se debe de seguir el procedimiento para determinar la humedad del suelo por gravimetría descrito en el capítulo 5.

Esta ecuación también se usa para calcular la concentración de $\text{NO}_3\text{-N}$, sustituyendo los valores de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ por los de $\text{NO}_3\text{-N}$.

IV. Interpretación

El amonio y el nitrato son formas solubles de nitrógeno que las plantas pueden absorber del suelo, por lo que su concentración en la solución del suelo es un indicador de la disponibilidad de N para las plantas en el momento del muestreo (pero no refleja condiciones futuras) (Hazelton y Murphy, 2007). En la Tabla 10.1 se presenta una clasificación de la concentración de nitrógeno inorgánico en el suelo con relación a su disponibilidad para algunas plantas comestibles.

De acuerdo con Horneck et al. (2011) la concentración de amonio en suelos de ecosistemas boscosos normalmente oscila 2 y 10 $\mu\text{g/g}$, con variaciones estacionales frecuentes, dependientes de los procesos de mineralización de nitrógeno, inmovilización microbiana, absorción por las plantas y lixiviación. Cuando las condiciones de temperatura y humedad del suelo son apropiadas para el crecimiento de las plantas y la actividad de los microorganismos, el amonio es absorbido por las plantas y microorganismos o transformado a nitrato por los microorganismos, por lo que éste generalmente no se acumula en el suelo durante la temporada de crecimiento (Horneck et al., 2011). Cuando se miden las concentraciones de amonio y nitrato de un suelo de manera repetida a través del año y su variación temporal es analizada, se pueden inferir patrones de acumulación en el suelo, mineralización y demanda por plantas y microorganismos. Sin embargo, el poder de inferencia depende del diseño del muestreo y del análisis de otros almacenes y procesos relacionados con el ciclaje de N en el suelo, como, por ejemplo, la concentración de nitrógeno microbiano (Anaya et al., 2007; Montaña et al., 2007).

Dados los rápidos cambios que pueden tener las concentraciones de amonio y nitrato en el suelo, para una correcta interpretación de los valores es necesario tener conocimientos del sistema de estudio, de las condiciones del suelo en el momento del muestreo y del manejo de la muestra antes de ser analizadas (e.g. tiempo y condiciones de almacenamiento) (Brady y Weil, 2013; Hazelton y Murphy, 2007). Cuando la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ es mayor que la de nitrato, puede sugerirse que el proceso de mineralización domina sobre el de nitrificación (Anaya et al., 2007). En contraste, cuando la concentración de nitrato domina sobre la de amonio, puede sugerirse que la nitrificación puede ser relativamente alta, probablemente relacionada con una baja disponibilidad de materia orgánica lábil como fuente de energía para la actividad microbiana (Montaña et al., 2007).

Tabla 10.1. Categorización de la concentración de nitrógeno inorgánico de la solución del suelo de acuerdo con la disponibilidad de este elemento para algunas plantas comestibles

| Clase | $\mu\text{g N g}^{-1}$ |
|----------|------------------------|
| Muy bajo | 0-10 |
| Bajo | 10-20 |
| Medio | 20-40 |
| Alto | 40-60 |
| Muy alto | >60 |

Fuente: Modificado de Semarnat (2002).

V. Autoevaluación

1. ¿Por qué los seres vivos requieren relativamente grandes cantidades de nitrógeno?
2. ¿Qué caracteriza al ciclo del nitrógeno?
3. ¿En qué consiste el proceso de fijación biológica de nitrógeno y quienes lo pueden realizar?
4. ¿En qué formas químicas se puede encontrar el nitrógeno en el suelo?
5. ¿En qué consisten los procesos de mineralización de nitrógeno y de nitrificación?
6. Con los datos de concentración de amonio y absorbancia que se presentan en la tabla de abajo calcula la ecuación de la recta. Para ello, grafica los datos en Excel con una gráfica de dispersión (X-Y), agrega una línea de tendencia lineal y presenta la ecuación del gráfico. Los valores de absorbancia se grafican en el eje X y los de concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en el eje Y.

| | | | | | |
|---|-------|-------|------|-------|-------|
| $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g/ml}$) | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 |
| Absorbancia | 0.104 | 0.323 | 0.44 | 0.708 | 1.077 |

7. Calcula las concentraciones de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ correspondientes a las absorbancias que se presentan en la tabla de abajo usando la ecuación de la recta generada en la pregunta anterior, y la concentración de amonio por gramo de suelo usando la ecuación 10.1. Para esto último, supón que el amonio se extrajo de 10 g de suelo con una humedad del 15%, se usaron 50 ml de extractante (KCl) y 3 ml de extracto para la determinación y el blanco tuvo una absorbancia de 0.118.

| | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbancia | 0.382 | 0.528 | 0.879 | 0.487 | 0.971 |
| $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (μg) | | | | | |
| $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g/g}$ suelo) | | | | | |

Fósforo disponible

11

Pamela Chávez Ortiz

Alberto Morón Cruz

En este capítulo se espera que el estudiante comprenda la importancia del fósforo del suelo y aprenda a medir la concentración de fósforo inorgánico disponible en el suelo por espectrofotometría.

I. Introducción

El fósforo (P) es un elemento esencial para los organismos vivos. En su estado de mayor oxidación (valencia +5), el P se encuentra como éster de fosfato ($R-H_2C-O-PO_3$), y es componente de biomoléculas esenciales, como los ácidos nucleicos, el ATP y fosfolípidos (Dyhrman et al., 2007). Por su parte, en su estado de menor oxidación (valencia de +3) se encuentran en forma de fosfonato que se caracteriza por su enlace directo carbono-fósforo ($R-C-PO_3H_2$), el cual es más estable que el de los ésteres de fosfato y, por lo tanto, más resistente a la degradación por factores químicos, térmicos, fotolíticos y enzimáticos (Hayes et al., 2000).

El ciclo del P se caracteriza porque no tiene fase gaseosa y porque su dinámica es controlada principalmente por reacciones geoquímicas con los minerales del suelo (Ruttenberg, 2003). La mayor parte del P inorgánico (Pi) disponible en el suelo proviene de la intemperización de minerales que contienen fosfatos, principalmente la apatita (Ruttenberg, 2003). El anión ortofosfato (HPO_4^{3-}), procedente del intemperismo de la apatita, es la forma principal de Pi disponible para la biota; sin embargo, esta forma química de P es poco abundante en la solución del suelo, ya que es muy reactiva, y puede generar diferentes tipos de moléculas por procesos de precipitación, disolución y **oclusión** (Frossard et al., 2000; Morón, 2014; Chávez-Ortiz, 2017).

La disponibilidad del Pi en el suelo depende de procesos biológicos como **inmovilización** y mineralización, y fisicoquímicos (geoquímicos) como **adsorción** y **desorción**. Estos procesos fisicoquímicos intervienen de manera importante en la disponibilidad, ya que una gran cantidad del Pi en el suelo permanece en el almacén inmóvil a través de reacciones de precipitación con cationes de Al^{3+} y Fe^{3+} en suelos ácidos y de Ca^{2+} en suelos alcalinos (Hao et al., 2002). En la presente práctica se describe el método de Olsen para estimar el Pi disponible del suelo (Kuo, 1996).

La oclusión del fósforo se refiere a la fijación física de los fosfatos por las partículas minerales del suelo, como los óxidos de aluminio y hierro.

En la mayoría de los suelos, la cantidad de fósforo disponible para las plantas en la solución del suelo en un momento dado es muy baja, rara vez supera el 0.01% del fósforo total del suelo.

II. Método

2.1. Principio

El método de Olsen incluye la extracción de Pi disponible de suelo y la determinación de su concentración por espectrofotometría (Kuo, 1996). Para la extracción del Pi disponible en forma de bifosfatos (HPO_4^-) se usa como extractante una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), la cual gracias a que se disocia en OH^- y CO_3^{2+} puede ser apropiada para suelos ácidos y calcáreos (Kuo, 1996). En suelos calcáreos, el bicarbonato incrementa la solubilidad del fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) al disminuir la concentración de Ca, ya que éste reacciona con el CO_3^{2+} precipitando como CaCO_3 . En suelos ácidos o neutrales, la solubilidad de los fosfatos de hierro y aluminio incrementa conforme el incremento de la concentración de OH^- disminuye la concentración de Al^{3+} por la formación de complejos de aluminato, y la de Fe^{3+} por la formación de un precipitado de óxido de hierro (Kuo, 1996).

La concentración de fosfato en el extracto se determina por espectrofotometría, siguiendo el método del ácido ascórbico (Hedley et al., 1982; Kuo, 1996): en un medio ácido, el fosfato reacciona con el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio y potasio, formando un complejo fosforo-molibdato, el cual se reduce al reaccionar con el ácido ascórbico a una solución de azul de molibdeno. La intensidad de color azul de la solución determina la concentración de fosfato.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|--|
| Vasos de precipitado de 50 ml |
| Probeta de 50 ml |
| Matraces aforados de acuerdo con el volumen de soluciones requeridas |
| Embudo de 50 ml (uno por muestra) |
| SopORTE para embudo (uno por muestra) |
| Filtro de papel Whatman No. 42 |
| Pipetas de 1 ml y 5 ml |
| Piseta con agua destilada |
| Espátula |
| Varilla de vidrio |
| Tubos de centrífuga |
| Equipos |
| Balanza analítica |
| Tamiz de 2 mm de amplitud de malla |
| Agitador orbital |

| |
|-------------------------------|
| Medidor de pH |
| Centrífuga |
| Espectrofotómetro luz UV-Vis |
| Celdas para espectrofotómetro |
| Campana de extracción |
| Horno de secado |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|--|--|
| Agua desionizada | N. A. |
| Carbonado de sodio (NaHCO_3) 0.5M. | Disolver 42 g de NaHCO_3 puro en 1 L de agua desionizada. |
| Hidróxido de sodio (NaOH) 1M. | Disolver 41.23 g de NaOH (al 97% de pureza) en 1 L de agua desionizada. |
| Ácido clorhídrico (HCl) 5M. | Disolver 413.5 ml de HCl (37.3% de pureza y densidad de 1.8 g cm^{-3}) en 1 L de agua destilada. |
| Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 14N. | Disolver 196 ml de H_2SO_4 puro en 500 ml de agua desionizada. |
| Tartrato de antimonio y potasio, ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.5% p/v | Disolver 0.5 g de $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada. |
| Solución de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). | Disolver 20 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 300 ml de agua desionizada, 450 ml de H_2SO_4 14N, 100 ml de tartrato de antimonio y potasio al 0.5%, y aforar a 1 L con agua desionizada. |
| Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) | N. A. |
| Solución para desarrollo de color | Disolver 0.5 g de ácido ascórbico en 100 ml de la solución de molibdato de amonio. |
| Cloroformo (CHCl_3) | N. A. |
| Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). Solución estándar de fósforo "A" (100 mg P/L, o 100 ppm de P) | Disolver 0.4394 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en 500 ml de agua, agregar 1.0 ml de cloroformo y aforar en 1 L de agua desionizada. |
| Solución estándar de fósforo "B" (10 mg P/L o 10 ppm de P) | Diluir 10 ml de la solución estándar de fósforo "A" en 100 ml de agua desionizada. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Extracción de fósforo disponible

- a) Pesa 3 g de suelo fresco tamizado en un tubo de centrifuga de 50 ml perfectamente limpio con detergente libre de fosfatos y seco. Agrega 30 ml de NaHCO_3 0.5 M (pH 8.5) utilizando una probeta de 50 ml.
- b) Adicionalmente, prepara dos tubos de centrifuga sin suelo, pero con los 30 ml de NaHCO_3 , estos serán los blancos del análisis.
- c) Si hubiera agregados del suelo en el tubo, rómpelos con una varilla de vidrio.
- d) Sacude el tubo en un agitador orbital a velocidad baja (150 rpm) por 16 h.
- e) Una vez agitado, centrifuga a 3,500 rpm por 20 min, y filtra la solución con papel filtro Whatman No. 42.
- f) Toma del filtrado una alícuota de 5 ml con una pipeta y verterlo en un matraz de 50 ml.
- g) Agrega agua desionizada hasta llegar aproximadamente a los 30 ml.
- h) Posteriormente acidifica con 0.50 ml de HCl 5M, agita manual e intermitentemente hasta desgasificar la muestra por completo.
- i) Neutraliza a pH 7 utilizando gotas de soluciones de NaOH 1 M y 0.5 M (realiza esto con ayuda de un potenciómetro calibrado o con papel pH).
- j) Transfiere la mezcla a un matraz volumétrico de 50 ml y afora con agua desionizada.

2.4.2. Determinación de fósforo por espectrofotometría de luz visible

- a) Toma 2.5 ml del extracto previamente neutralizado y colócalo en un tubo de centrifuga de 50 ml.
- b) Añade lentamente 2.5 ml de la solución para desarrollo de color (molibdato de amonio y ácido ascórbico).
- c) Afora con agua a 25 ml.
- d) Deja reposar a 25 °C durante 15-30 min para que se desarrolle el color.
- e) Coloca la solución coloreada en una celda para espectrofotómetro, lee en absorbancia a una $\lambda=882$ nm y anota el resultado. No dejes pasar más de 1 h después de haber agregado la solución de desarrollo de color, ya que su color se degrada y los resultados no son fiables.
- f) Para determinar la concentración de P a partir de los datos de absorbancia, debes preparar una curva de calibración concentración-absorbancia siguiendo las concentraciones de P indicadas en la Tabla 11.1.
- g) Una vez obtenidos los valores de absorbancia de la curva de calibración, grafica la absorbancia obtenida (eje x) vs. la concentración

de Pi en ppm (eje Y) y obtener la función lineal acoplada a los datos ($Y=mx+b$). Con esta ecuación se pueden estimar las concentraciones de P de las muestras.

Tabla 11.1. Valores de referencia para la realización de la curva de calibración para la determinación de fósforo (P)

| Curva de calibración | Concentración de P en la curva ($\mu\text{g} / \text{g}$) | Volumen de la solución B (ml) | Aforar con agua (ml) |
|----------------------|---|-------------------------------|----------------------|
| Absorción 1 | 0.025 | 0.125 | 50 |
| Absorción 2 | 0.05 | 0.25 | 50 |
| Absorción 3 | 0.1 | 0.5 | 50 |
| Absorción 4 | 0.2 | 1 | 50 |
| Absorción 5 | 0.4 | 2 | 50 |
| Absorción 6 | 0.8 | 4 | 50 |

Fuente: Semarnat, 2002.

III. Cálculos

Una vez determinada la concentración de fósforo en los extractos, se debe calcular la concentración de este elemento por unidad de masa de suelo con la siguiente fórmula (11.1):

$$P = ((P_{\text{muestra}} - P_{\text{Bco}}) * E) / S$$

Donde:

- P = concentración de fósforo ($\mu\text{g} / \text{g}$ suelo seco)
- P_{muestra} = concentración de P de la muestra ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
- P_{Bco} = concentración de P del blanco ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
- E = volumen de extractante de NaHCO_3 (ml)
- S = cantidad de suelo seco usada (g)

Nota: en la extracción se usa suelo fresco por lo que hay que determinar el peso seco usado. Esto se hace determinando la humedad del suelo fresco por gravimetría y calculado el peso seco a través de una regla de tres simple (ver método 5).

IV. Interpretación

El P está presente en el suelo en diferentes formas químicas (véase Hedley et al., 1982), el método de Olsen permite determinar el Pi extraíble de la solución del suelo, el cual representa la fracción del Pi del suelo que está en equilibrio con la fase sólida del Pi bajo las condiciones prevalecientes en el suelo (Kuo, 1996). La fracción de Pi extraíble normalmente es muy pequeña, pero es la más accesible para las raíces de las plantas, por lo que se usa como un indicador de la disponibilidad de Pi en el momento del muestreo (Kuo, 1996). En la agricultura, los valo-

res de concentración de Pi disponible suelen ser usados para determinar la necesidad de fertilización y las dosis de fertilizante de Pi requeridas para el crecimiento de las plantas (Hazelton y Murphy, 2007; Horneck et al., 2011). En este sentido, para una primera interpretación de la disponibilidad de Pi en el suelo, se pueden contrastar los valores obtenidos con los valores de referencia que se muestran en las Tablas 11.2 y 11.3.

Tabla 11.2. Clasificación de los valores de referencia de Pi disponible para pastizales con diferente textura del suelo cuando el pH en CaCl es mayor a 5.0. Se presentan valores de Pi disponible determinados con tres diferentes métodos

| Textura del suelo | Estado del fósforo | Nivel de fósforo | | |
|-------------------|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | | Olsen-P $\mu\text{g} / \text{g}$ | Bray-P $\mu\text{g} / \text{g}$ | Colwell-P $\mu\text{g} / \text{g}$ |
| Franco arenoso | Bajo | 0-7 | 0-8 | 0-14 |
| | Medio | 7-15 | 8-15 | 14-20 |
| | Alto | >15 | >15 | >20 |
| Franco | Bajo | 0-8 | 0-10 | 0-16 |
| | Medio | 8-18 | 10-18 | 16-30 |
| | Alto | >18 | >18 | >30 |
| Franco arcilloso | Bajo | 0-9 | 0-10 | 0-18 |
| | Medio | 9-24 | 10-20 | 18-40 |
| | Alto | >24 | >20 | >40 |
| Arcilloso | Bajo | 0-13 | 0-10 | 0-30 |
| | Medio | 13-30 | 10-20 | 30-80 |
| | Alto | >30 | >20 | >80 |

Fuente: Clement y McGowen, 1994 en Hazelton y Murphy, 2007.

Nota: Los métodos de Bray y Colwell normalmente permiten extraer más Pi disponible del suelo, por lo que suelen mostrar valores más altos que los obtenidos con el método de Olsen (véase Kuo, 1996).

Tabla 11.3. Valores de referencia de P disponible en suelos

| Clase | P ($\mu\text{g} / \text{g}$) |
|-------|--------------------------------|
| Bajo | <5.5 |
| Medio | 5.5-11 |
| Alto | >11 |

Fuente: Semarnat, 2002.

V. Autoevaluación

1. ¿Qué diferencia hay entre el éster de fosfato y el fosfonato?
2. ¿Qué diferencia hay entre el ciclo del fósforo y el del nitrógeno? (revisar también el apartado 10)
3. ¿Qué forma inorgánica del fósforo pueden tomar las plantas?
4. ¿Qué procesos biogeoquímicos afectan la disponibilidad de fósforo en el suelo?
5. Con los datos de concentración de fosfato (H_2PO_4) y absorbancia que se presentan en la tabla de abajo calcula la ecuación de la recta. Para ello grafica los datos en Excel con una gráfica de dispersión (X-Y), agrega una línea de tendencia lineal (usa el botón derecho del mouse) y presenta la ecuación del gráfico.

| | | | | | | |
|--|------|-------|-------|-------|-----|-------|
| H_2PO_4 ($\mu\text{g/ml}$) | 0.0 | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 8 |
| Absorbancia | 0.06 | 0.091 | 0.108 | 0.236 | 0.4 | 0.653 |

6. Calcula las concentraciones de fósforo (en $\mu\text{g/ml}$) correspondientes a las absorbancias que se presentan en la tabla de abajo usando la ecuación de la recta generada en la pregunta anterior, y la concentración de fósforo por gramo de suelo usando la ecuación 11.1. Para esto último, supón que el fósforo inorgánico se extrajo de 3 g de suelo con una humedad del 13%, usando 30 ml de extractante (NaHCO_3).

| | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbancia | 0.252 | 0.186 | 0.415 | 0.091 | 0.324 |
| H_2PO_4 ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
| H_2PO_4 ($\mu\text{g/g}$) | | | | | |

III. Biología del suelo

El suelo es un hábitat para una gran diversidad de organismos vivos. Estos organismos se han clasificado por su tamaño y naturaleza en: a) microflora, que incluye bacterias, algas y hongos; b) microfauna comprendida por organismos menores a 0.2 mm de tamaño, como protozoarios y nematodos; c) mesofauna conformada por organismos con tamaño de entre 0.2 y 2 mm como ácaros, colémbolos, sínfilos, proturos, dipluros, paurópodos, nematodos, y pequeños insectos de varios ordenes; y d) macrofauna que incluye animales con talla mayor a 2 mm, entre los que se encuentran lombrices, arácnidos, insectos y termitas (Coleman y Wall, 2015). Los organismos del suelo se organizan en una intrincada **red trófica**, también llamado sistema descomponedor, en la que están presentes diferentes estrategias alimenticias, incluyendo: saprófagos, bacteriófagos, fungívoros, depredadores y omnívoros (Lavelle y Spain, 2001). Entre estos organismos hay algunos que interactúan con las plantas, considerándose como herbívoros, mutualistas, simbios, facilitadores o parásitos de éstas. Además, todos estos organismos interactúan con el medio físico y químico del suelo, el cual los condiciona y al cual modifican a través de sus actividades (Varoney, 2007). A través de estas interacciones, los organismos influyen sobre los procesos de transformación y flujo de materia y energía, que dan integridad al ecosistema (Paul, 2015). Los organismos del suelo son muy sensibles a las perturbaciones por lo que se han considerado indicadores tempranos de cambios en las condiciones del suelo (Kennedy y Stubbs, 2006). La biota del suelo normalmente se evalúa en términos de abundancia o densidad de organismos; diversidad o riqueza, es decir, el número de diferentes especies o grupos presentes, y actividades o funciones específicas (Thies, 2006).

En esta sección se describen algunas metodologías de uso frecuente que permiten caracterizar la presencia, abundancia y funciones de algunos grupos de organismos del suelo que son usados como indicadores del estado y funcionamiento del suelo, como lo son los microartrópodos del suelo, los microorganismos cultivables y los hongos micorrízicos.



Riqueza y abundancia de microartrópodos del suelo

12

Margarita Ojeda Carrasco

En este capítulo se espera que el alumno reconozca la importancia de los artrópodos del suelo, identifique algunos grupos importantes de éstos y aprenda a extraerlos mediante el método del embudo Berlese-Tullgren para el análisis de su comunidad.

I. Introducción

Los microartrópodos son los principales representantes de la mesofauna del suelo (Coleman y Wall, 2015). Se caracterizan por medir menos de 2 mm y poseer un exoesqueleto, conocido como cutícula, con una serie lineal de segmentos y apéndices de piezas articuladas (Lavelle y Spain, 2001). La comunidad de microartrópodos se congrega principalmente en el mantillo y en la capa superficial del suelo entre los 0 y 20 cm, en la cual se distribuye de manera agregada y no de forma uniforme (Wallwork, 1976; Palacios-Vargas et al., 2014). Su movimiento en la matriz del suelo es a través de los poros, grietas e interfaces del mantillo y suelo (Lavelle y Spain, 2001). La densidad de microartrópodos varía entre ecosistemas, en el mantillo de bosques templados se han reportado densidades de entre 33 y 88 x 10³ individuos / m², en bosques de coníferas con una abundante capa de mantillo se han estimado hasta 130 x 10³ individuos / m², mientras que en bosques tropicales con una delgada capa de mantillo la densidad de individuos es mucho menor (Coleman y Wall, 2015). Los grupos de microartrópodos más diversos y abundantes en la mayoría de los suelos forestales son los oribátidos (*Acari*) y los colémbolos (*Hexápoda*); su densidad puede alcanzar miles de individuos por metro cuadrado, con una diversidad de entre 50 y 100 especies (Iraola, 2001; Karyanto et al., 2012; Iturrondobeitia et al., 2004). En comparación con los oribátidos, los colémbolos son más dependientes de altas humedades, así como más restrictivos en su dieta; algunas especies son microbívoras que se alimentan de hongos y bacterias, y otras herbívoras que comen algas y plantas vivas o depredadores de microfauna; es decir, éstos pueden ubicarse en distintos niveles de la red trófica del suelo (Wurst et al., 2012).

Los microartrópodos del suelo se caracterizan por fragmentar y alimentarse del **detrito** de plantas y animales, jugando un papel determinante en la descomposición (Coleman y Wall, 2015). La fragmentación incrementa el área superficial de los residuos orgánicos y deja expuesto material del citoplasma de las células, facilitando la colonización

Los microartrópodos juegan un papel importante en las redes tróficas de los suelos, funcionando como microbívoros, depredadores y presas de macroartrópodos, como arañas, escarabajos, hormigas y ciempiés.

y descomposición de éstos por la microflora. Al alimentarse, los artrópodos son reconocidos como dispersores de microorganismos, ya que estos últimos frecuentemente están adheridos a los exoesqueletos o sobreviven al paso a través del tracto digestivo de los artrópodos (Coleman y Wall, 2015). Así, se ha visto que los microartrópodos tienden a acelerar la descomposición de la materia orgánica del suelo en diferentes ecosistemas (García-Palacios et al., 2013). Koehler (1992) considera a la mesofauna edáfica como la “*webmaster*” del ecosistema por sus efectos sobre la descomposición del mantillo, la conexión de la red trófica y la formación del suelo.

Los microartrópodos del suelo se han usado como indicadores de cambios ecológicos debido a su respuesta rápida a perturbaciones del ambiente, a su importancia ecológica, abundancia, diversidad y facilidad de recolección (Parisi et al., 2005; Guillen et al., 2006; Barbercheck et al., 2009; Bedano et al., 2005; Behan-Pelletier, 1999). Asimismo, debido a su papel como promotores de servicios de los ecosistemas (i.e. fertilidad del suelo, secuestro de carbono, infiltración de agua), los microartrópodos del suelo han sido considerados en la evaluación de los riesgos asociados con el cambio climático y el uso intensivo del recurso suelo (Bardgett y van der Putten, 2014).

Uno de los métodos más comunes para extraer y estudiar la fauna del suelo es el denominado embudo Berlese-Tullgren (Coleman y Wall, 2015), el cual se describe en la presente práctica.

Los microartrópodos son muy sensibles a los incendios, la labranza y el uso de pesticidas por lo que en suelos agrícolas sus poblaciones suelen menguar.

II. Método

2.1. Principio

La extracción de la fauna del suelo con el método Berlese-Tullgren consiste en dirigir el movimiento de la microfauna del suelo o mantillo en una dirección descendente dentro de un embudo, con el uso de una luz y el calor moderado producidos por un foco incandescente; la microfauna atraviesa por una malla de un tamaño determinado que criba a individuos por su tamaño hasta un recipiente de recogida que contiene una solución a base de alcohol para su conservación. Para mayor eficacia en la extracción, el embudo debe tener paredes interiores lisas para que los organismos resbalen fácilmente por éste.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Botellas de PET de 2.5 L para ser usadas como embudos |
| Malla de plástico de 1 mm de apertura |
| Frascos de plástico de 5 x 3 cm con tapa |

| |
|-----------------------------|
| Bolsas de plástico |
| Foco incandescente de 25W |
| Cajas de Petri |
| Pala y/o cilindro extractor |
| Piseta con agua destilada |
| Portaobjetos y cubreobjetos |
| Pinceles y agujas |
| Equipos |
| Microscopio óptico |
| Microscopio estereoscópico |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|------------------------------------|--|
| Agua destilada | N. A. |
| Alcohol etílico al 70% (comercial) | N. A. |
| Glicerina | N. A. |
| Ácido láctico | N. A. |
| Solución conservadora | 60% de alcohol etílico, 30% de agua y 10% de glicerina |
| Líquido de Hoyer o CMC-10 | N. A. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

- a) Dentro del sistema de estudio, colecta mantillo y/o suelo de la capa superficial (0-5 cm) para analizar la fauna que habita en estos. Colecta el mantillo de un área circular de 10 cm de diámetro con el uso de una pala pequeña de jardinero y colócalo en cilindro o nucleador de 5 cm de diámetro y 5 de profundidad, para no alterar su estructura. Deposita la muestra dentro de una bolsa de plástico y anota sus datos de colecta (fecha, lugar, colector, profundidad, sitio de colecta, condiciones ambientales prevalecientes). Es importante mantener las muestras en la sombra, y de preferencia dentro de una hielera fresca.
- b) En el laboratorio conserva las muestras a una temperatura de 11-13 °C hasta su procesamiento para la extracción de los microartrópodos. Debes recordar que el almacenamiento prolongado puede afectar la sobrevivencia de los organismos y, por lo tanto, los resultados que se obtengan.
- c) Prepara el embudo Berlese-Tullgren. Una forma económica de preparar este embudo es como se muestra en la Figura 12.1: corta transversalmente con una navaja una botella de PET de 2.5 L a una

distancia aproximada de 10 cm de la base. Lava con jabón la parte superior para su uso como embudo. Dentro de esta parte en forma de embudo, coloca una malla de 1 mm de poro en la parte de la boca. Acopla este embudo sobre una base que lo sostenga de manera vertical con la boca hacia abajo, y por fuera de su boca coloca un frasco de recogida con la solución conservadora de alcohol y glicerina. Finalmente, por dentro del embudo y encima de la malla, coloca la muestra de mantillo o suelo, y prende un foco por arriba de ella a una distancia de 15 cm. Este sistema se deja de 5 a 7 días para tratar de coleccionar a la mayoría de los organismos (Dindal, 1990).

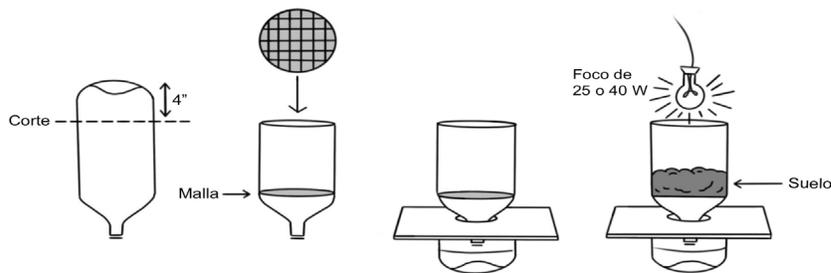


Fig. 12.1. Fabricación de un embudo de Berlese para la extracción de microartrópodos del suelo con materiales reciclados.

- d) Una vez transcurrido el tiempo de extracción, etiqueta los frascos colectores con los códigos originales de las muestras, y procede a la separación y cuantificación de los grupos presentes. Para ello, vierte la solución con los artrópodos al interior de una caja de Petri, y observa los organismos con el microscopio estereoscópico. Extrae los individuos con la ayuda de un pincel o pinzas, sepáralos y contabilízalos de acuerdo con su afinidad morfológica, y colócalos por grupos dentro de diferentes frascos de 20 ml con solución de alcohol y glicerina.
- e) Si es posible y lo consideras necesario, puedes elaborar preparaciones semipermanentes en portaobjetos utilizando ácido láctico, glicerina, alcohol etílico y glicerina, así como líquido de Hoyer / CMC-10.
- f) Elabora un listado de los grupos encontrados, así como una base de datos con el número de organismos por **morfoespecie** presentes en cada una de las muestras. Esta información servirá para calcular la abundancia, riqueza y dominancia de los microartrópodos presentes.

III. Cálculos

Para determinar la clase y orden de cada morfoespecie se puede usar la *Guía ilustrada de artrópodos edáficos* (Palacios-Vargas et al., 2014) u otras claves de artrópodos existentes, como la de Dindal (1990) y Krantz y Walter (2009).

Con los datos obtenidos se determinarán: a) riqueza de especies, b) abundancia de cada morfoespecie y/o de todos los microartrópodos, c) índices ecológicos de Simpson y Shannon-Weaver y, d) si se realiza un estudio comparativo, se calculará el coeficiente de Jaccard (Magurran, 2004); brevemente:

- Riqueza de especies. Número de morfoespecies por sitio o totales.
- Abundancia. En cada muestreo realizado se establece la abundancia de artrópodos del suelo, calculando el número de individuos por m². Se puede determinar la contribución de cada grupo a la abundancia total, tabulada como frecuencia.
- Diversidad. Para evaluar la diversidad de cada uno de los sitios, se determina la riqueza o número total de morfoespecies y se calculan los índices de diversidad de Shannon-Weaver (H') y Simpson (Ds):

Shannon-Weaver (12.1)

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \cdot \ln(p_i)$$

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

Simpson (12.2)

$$D_s = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde:

H' = índice de Shannon-Weaver

S = número de especies o morfoespecies

p_i = proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos de la comunidad (N); es decir la abundancia relativa de la especie i

n_i = número de individuos de la especie i

N_i = número total de individuos de la comunidad

D_s = índice de Simpson

- Si el muestreo se realiza en dos o más sistemas, se puede calcular la similitud de su diversidad con el coeficiente de Jaccard (Cj) (Magurran, 2004). Este coeficiente se basa en la relación presencia-ausencia entre el número de morfoespecies en cada sistema y el total de morfoespecies de los sistemas (12.3):

$$C_j = C / (A + B - C)$$

Donde:

C_j = coeficiente de Jaccard

C = número de morfoespecies comunes a ambos sistemas

A = número de morfoespecies encontradas en el sistema A

B = número de especies encontradas en el sistema B

IV. Interpretación

La interpretación de los resultados depende del sistema de estudio seleccionado. Sin embargo, se pueden tomar algunas de las siguientes consideraciones. Respecto a la diversidad, la medida más simple de ésta es la riqueza de especies, la cual es el número total de especies o morfoespecies encontradas. Entre mayor es la riqueza de especies, mayor es la diversidad. Los índices de diversidad de Shannon-Weaver y Simpson, además de considerar el número de especies, toman en cuenta la homogeneidad o uniformidad de las abundancias de las especies en la comunidad. Por ejemplo, subjetivamente el grado de diversidad de un bosque compuesto por 10 especies de plantas, cada una de ellas igualmente representadas, es mayor que la de un bosque con 10 especies, de las cuales una especie contribuye con 91% de los individuos y las otras con 1% cada una.

Ambos índices de diversidad incrementan conforme la riqueza de especies es mayor, para un dado patrón de uniformidad. Asimismo, ambos índices incrementan conforme la uniformidad incrementa, para una riqueza dada. No obstante, estos índices no ordenan a las comunidades de la misma manera ya que el índice de Simpson es menos sensible a la riqueza de especies y más sensible a la uniformidad que el índice de Shannon-Weaver, (Colwell, 2009).

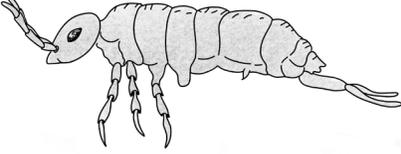
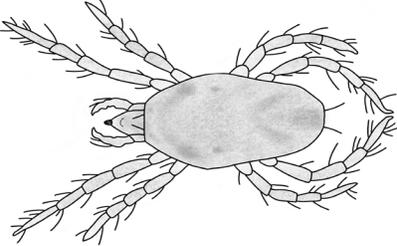
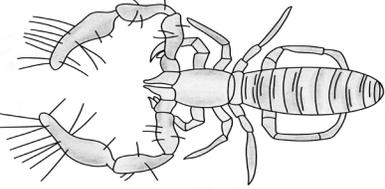
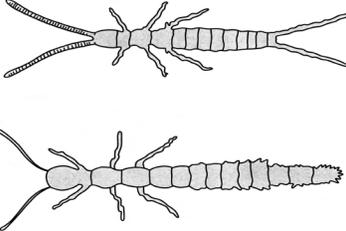
El coeficiente de similitud de Jaccard toma valores entre 0 y 1; donde un valor de 1 corresponde a la igualdad total de ambas comunidades, y un valor de 0 corresponde a una desigualdad total entre comunidades.

La riqueza de especies y la diversidad de grupos funcionales de microartrópodos pueden ser indicadores de la calidad del suelo y de la complejidad de la red trófica.

V. Autoevaluación

1. ¿Qué características distintivas presentan los microartrópodos?
2. ¿En qué capas del suelo son más abundantes los microartrópodos?
3. ¿Cómo pueden influir los microartrópodos sobre la descomposición de los detritos del suelo?

4. ¿Qué papeles pueden jugar los microartrópodos en la red trófica del suelo?
5. Usando la *Guía de ilustrada de artrópodos edáficos* (Palacios-Vargas et al., 2014) identifica a qué Clase/Orden pertenecen los microartrópodos que se ilustran en la tabla de abajo.

| Ilustración | Clase/orden |
|---|-------------|
|  | |
|  | |
|  | |
|  | |

Aislamiento de microorganismos de muestras ambientales

13

Yunuen Tapia Torres

En este capítulo se espera que el estudiante aprenda los métodos de aislamiento de microorganismos de muestras ambientales y de crecimiento de colonias microbianas en medios de cultivo sólidos.

I. Introducción

Los microorganismos se consideran los grupos más abundantes y diversos de la Tierra (Bardgett y van der Putten, 2014; Delgado-Baquerizo et al., 2018). Los microorganismos del suelo se han subdividido en microflora y microfauna. La microflora comprende a las bacterias, arqueas, actinomicetos y hongos; mientras que la microfauna comprende diversos animales de tamaño pequeño, incluyendo protozoarios, nematodos y rotíferos (Lavelle y Spain, 2001). La microflora se caracteriza por ser el motor de diversos procesos biogeoquímicos que regulan el flujo de materia y energía en el ecosistema (Schlesinger y Bernhardt, 2013). Por ejemplo, las bacterias influyen sobre el flujo de materia y energía, regulando las reacciones químicas que ocurren en el reciclado de carbono y nutrientes a través de su metabolismo (Schlesinger y Bernhardt, 2013). A pesar de que los microorganismos determinan la biogeoquímica de los suelos, interactúan positiva o negativamente con las plantas e influyen sobre la estructura del suelo, se tiene poca comprensión acerca de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas, así como de su dinámica (Bardgett y van der Putten, 2014).

La caracterización de las comunidades microbianas en el suelo se ha estudiado por métodos genéticos con marcadores moleculares y a través de métodos de cultivo. Si bien sólo una pequeña proporción de los organismos del suelo es cultivable, los métodos de cultivo son ampliamente usados para estudiar y caracterizar a los microorganismos, por ejemplo, para determinar las capacidades metabólicas de un microorganismo (Tapia-Torres et al., 2015; Tapia-Torres et al., 2016).

En los ambientes naturales, los microorganismos conviven en mezclas complejas de poblaciones de especies que comparten **nichos ecológicos**. Con el objetivo de poder estudiar a los microorganismos y poder entender su función en los ecosistemas, es necesario separarlos a partir de la comunidad microbiana en la que se encuentran en la naturaleza. Para ello se han empleado procedimientos para aislar e identificar distintos tipos de microorganismos basados en cultivos. Los

Las bacterias y arqueas son fisonómicamente similares por ser procariontes unicelulares con carencia de núcleo y organelos, sin embargo, estudios genéticos han mostrado que ambos grupos son, en términos de distancia filogenética o evolutiva, tan distintas entre sí como lo son de los eucariontes.

Estudios que conjugan el cultivo de organismos y métodos genéticos mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar los genes 16S RNA directamente del ADN extraído del suelo muestran que alrededor del 1% de la microflora del suelo es cultivable.

microorganismos se pueden cultivar en medios nutritivos sólidos, semi-sólidos o líquidos que se diseñan para cubrir todas sus necesidades nutricionales (Madigan et al., 2009). Una vez cultivados y cuando están en una proporción adecuada, los microorganismos se pueden aislar directamente a partir de una muestra; sin embargo, cuando éstos se encuentran en una proporción baja en la muestra ambiental, se lleva a cabo un procedimiento de búsqueda que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos de interés. Posteriormente, se aísla por el método de estrías o por dilución. Aquí se describe el método de aislamiento por dilución utilizando perlas de cristal en medios de cultivo sólidos.

II. Método

2.1. Principio

El método consiste en aislar o extraer microorganismos del suelo con una solución buffer al pH del suelo, seguido del cultivo de los microorganismos en cajas de Petri con medios de cultivos sólidos seleccionados (Kandeler, 2007). Se cuentan el número de colonias formadas en los medios de cultivo y se describen las características morfológicas de éstas para determinar grupos funcionales y abundancias. Una cuestión importante antes de iniciar los ensayos es la selección del medio de cultivo porque de ello dependerán los resultados u organismos a registrar (Tortora et al., 2010). Para el conteo de poblaciones de microorganismos heterótrofos totales en el suelo, generalmente se emplea un medio de cultivo no selectivo. Alternativamente, para el conteo de poblaciones de microorganismos particulares se pueden elegir medios de cultivo selectivos, los cuales seleccionan ciertos nutrientes, omiten algunos de ellos y/o regulan las condiciones de incubación con la finalidad de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y promover el de otros (Tortora et al., 2010). Para la selección de algunos medios para el cultivo de bacterias, hongos y actinomicetos véase Germida y de Freitas (2008).

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Cajas de Petri de plástico esterilizadas |
| Matraz de Erlenmeyer de 1 L (uno por medio de cultivo a preparar) |
| Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml estériles |
| Gradilla para tubos de microcentrifuga |
| Perlas de cristal estériles |
| Puntas de 1 ml estériles |
| Algodón |

| |
|--|
| Masking tape |
| Marcador permanente |
| Mechero |
| Probeta |
| Espátula |
| Papel aluminio |
| Cinta testigo para esterilizar |
| Micropipeta de 1 ml |
| Bolsas de plástico de cierre hermético |
| Equipos |
| Microscopio estereoscópico |
| Autoclave |
| Balanza digital |
| Incubadora |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|--|--|
| Agua destilada estéril | N. A. |
| Alcohol al 70% (comercial) | N. A. |
| Medios de cultivo estériles | N. A. |
| TRIS (Base) ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) | N. A. |
| Ácido maléico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$) | N. A. |
| Ácido Bórico (H_3BO_3) | N. A. |
| Buffer de extracción de células bacterianas estéril (MUB; Modified Universal Buffer 5X). | Disolver 6.05 g de TRIS (Base), 5.8 g de Ácido maléico, 7.0 g de ácido cítrico y 3.15 g de ácido bórico en 244 ml de agua destilada, y aforar a 500 ml con agua destilada. Esta solución de MUB está a 5x y queda con un pH final de aproximadamente 2 |
| Hidróxido de sodio (NaOH) 1M | Para NaOH al 97% de pureza, disolver 41.23 g de NaOH en 1 L de agua desionizada. |
| MUB 1X a pH de la muestra | Ajustar el pH requerido. Por ejemplo, para un MUB pH 5, mezclar 20 ml de MUB 5X con aproximadamente 2.8 ml de NaOH 1M, y aforar a 100 ml con agua desionizada. Para un MUB pH 9, mezclar 20 ml de MUB 5X con aproximadamente 6 ml de NaOH 1M, y aforar a 100 ml con agua desionizada. Este buffer se puede sustituir por agua destilada estéril. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Preparación de medio de cultivo y cajas de Petri

- a) Prepara tres medios de cultivo distintos siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Prepararás medio litro de cada medio de cultivo utilizando matraces de Erlenmeyer de 1 L, debidamente tapados. Los medios de cultivo no deben sobrepasar la mitad de la capacidad del matraz, esto con el objetivo de que el medio de cultivo no se derrame al momento de **esterilizar**. Esteriliza en olla de presión o autoclave, según indicación del profesor.
- b) Una vez que el medio de cultivo esté esterilizado, prepara las cajas de Petri, con cuidado de mantener el mechero cerca de éstas para generar un ambiente estéril y evitar contaminación. En caso de contar con campana de flujo laminar, se recomienda hacer uso de ella.

2.4.2. Medios de cultivo sólidos

- a) Pesa la cantidad adecuada del medio (de acuerdo con el volumen indicado) según las especificaciones del fabricante en una balanza digital.
- b) Coloca el medio de cultivo pesado en un matraz de Erlenmeyer.
- c) Agrega el agua destilada al matraz, utilizando una probeta para medir la cantidad requerida.
- d) Disuelve el medio agitando lentamente, calienta con agitación (sin llegar a ebullición) hasta que el medio se vea translucido, tapa la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa y coloca un gorro de papel estraza o aluminio.
- e) Esteriliza a 15 lb durante 15 o 20 min.

2.4.3. Medios de cultivo vertidos en placas

- a) Coloca las cajas de Petri de plástico (ya estériles de fábrica) en la mesa de trabajo previamente limpiada con alcohol al 70%. Ten el mechero encendido y abarca un radio aproximado de 30 a 35 cm de diámetro, para lograr con ello una zona de esterilidad.
- b) Enfría el medio de cultivo entre 50 y 45 °C (hasta tolerar en la palma de la mano) y vacía 15 ml aprox. en cada caja.
- c) Después de verter el medio, tapa la placa cuidadosamente para no salpicar la tapa.
- d) Es posible que destapes la caja dejando una pequeña abertura para que el vapor de agua no se condense en la tapa (deben de estar en zona estéril) y, pasados unos minutos, tapa completamente.
- e) Espera a que solidifique el medio de cultivo y refrigera en posición invertida para su posterior uso. Si los medios de cultivo se van a utilizar el mismo día no se recomienda esterilizar, en ese caso es recomendable **inocular** las cajas lo antes posible e incubar.

- f) Para vaciar el medio de cultivo a la caja de Petri, retira el tapón del matraz, sin dejarlo en la mesa, y pasa su boca por la flama del mechero, luego levanta la tapa de la caja de Petri estéril, solamente lo necesario para permitir la entrada del cuello del matraz para vaciar el agar. Flamea la boca del matraz y tápalo cuantas veces sea necesario hasta terminar con el vaciado y llenado de todas las cajas de Petri.

2.4.4. Obtención de la muestra ambiental

Deberás llevar al laboratorio una muestra ambiental (suelo, sedimento, agua) de tu interés para analizar los microorganismos presentes. Para muestras de suelo o sedimento: colecta 5 g de material (suelo o sedimento), colócalo en una bolsa de plástico hermética limpia y refrigera. Para muestras de agua: colecta 5 ml de agua en un frasco de plástico estéril.

2.4.5. Extracción de células microbianas

- a) En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml adiciona suelo o agua hasta llegar a la marca de 0.5 ml.
 b) Agrega 800 μl de buffer de extracción MUB 1X a pH de la muestra estéril o agua destilada estéril.
 c) Agita durante 30 min.
 d) Haz diluciones (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3}) utilizando el buffer de extracción (MUB). Para una dilución 1×10^{-1} se toman 100 μl de la muestra (1×10^0) y 900 μl de MUB. Para una dilución 1×10^{-2} se toman 100 μl de la dilución 1×10^{-1} y 900 μl de MUB. Para una dilución 1×10^{-3} se toman 100 μl de la dilución 1×10^{-2} y 900 μl de MUB (Figura 13.1).

Las diluciones propuestas en este método se realizan para poder hacer un conteo confiable de las unidades formadoras de colonia (UFC).

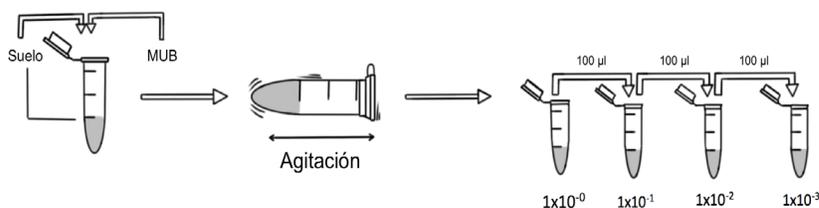


Figura 13.1. Extracción de células microbianas y metodología para hacer las diluciones.

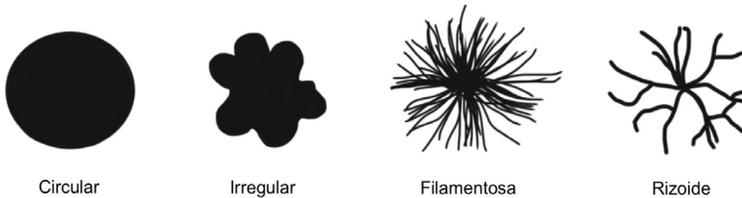
- e) Inocula o siembra cada medio de cultivo, colocando 100 μl de la muestra (de la dilución de trabajo) en el centro de la caja Petri y extendiendo homogéneamente en la superficie utilizando perlas de cristal estériles.

- f) Etiqueta las cajas de Petri con la siguiente información en el contorno de la parte inferior: 1) nombre del medio de cultivo, 2) nombre de la muestra (lugar de colecta), 3) dilución, 4) fecha y 5) propietario.
- g) Incuba a 28 °C y monitorea el crecimiento de las colonias diariamente.

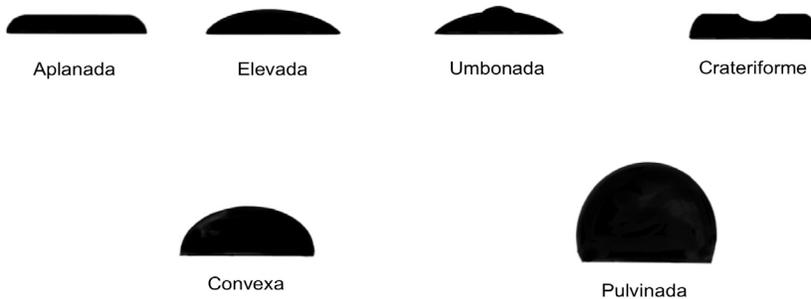
III. Análisis de morfología de la colonia

Los análisis de los datos consisten en realizar una descripción de la morfología de las colonias de los diferentes aislamientos que se realizaron y hacer comparaciones entre los medios de cultivo utilizados. Se recomienda utilizar la dilución en donde el crecimiento de las colonias permite ver claramente las características de cada colonia, y es posible realizar esta descripción con ayuda de un estereoscopio, aunque no es indispensable. La descripción se hace teniendo en cuenta tamaño (en mm), forma, elevación, borde, textura, color, opacidad y consistencia, como se describe a continuación:

- a) Forma: circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide, puntiforme, etcétera.



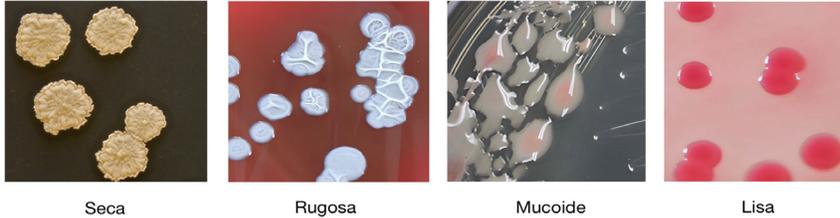
- b) Elevación: aplanada, elevada, umbonada, crateriforme, convexa, pulvinada, etcétera.



- c) Borde: continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festoneado, filamentoso, etcétera.



- d) Texturas: escamosa, rugosa, plegada, granulosa.
- e) Color: las colonias presentan una gran variedad de colores (blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.), en algunos casos presentan brillo por la luz reflejada en ellas.
- f) Opacidad: transparente, translúcida, opaca.
- g) Consistencia: seca, rugosa, mucoide y lisa.



Seca

Rugosa

Mucoide

Lisa

IV. Interpretación

El método de aislamiento y cultivo de muestras ambientales es un método relativamente sencillo y rápido para aislar y contar microorganismos cultivables. Un problema con los conteos que se obtienen con este método es que pueden ser de 10 a 100 veces menores que los determinados a través de un frotis de suelo y su observación por microscopía, debido a la incapacidad de proporcionar los nutrientes y condiciones que requiere los diferentes microorganismos para crecer en un medio de cultivo y a que en los frotis se pueden contar células viables y no viables (Germida y de Freitas, 2008). No obstante, los métodos de cultivo pueden ser usados no sólo para contar poblaciones microbianas; sino también como fuente de partida para el aislamiento de organismos, lo cual es uno de los principales usos de este método (Germida y de Freitas, 2008; Thies, 2006). En este último caso, se aísla una colonia y se cultiva repetidamente en un medio de crecimiento adecuado para aislar **cepas** puras. Después de varias transferencias de este tipo o cepa, se puede cultivar y preservar para su posterior estudio e identificación. Por ejemplo, una vez aislada una cepa microbiana se puede estudiar su capacidad metabólica (Tapia-Torres et al., 2015; 2016).

Como se mencionó previamente, la cantidad de microorganismos cultivables de un suelo suele ser baja, por lo que el método descrito puede tener limitaciones de interpretación, sobre todo respecto a diversidad microbiana; en este sentido se ha sugerido que ningún medio de cultivo o conjunto de condiciones, o incluso una gran variedad de medios de cultivo y condiciones de incubación diferentes, permiten enumerar o capturar la diversidad de microorganismos existente en el suelo (Thies, 2006). No obstante, dado que los microorganismos suelen ser muy susceptibles a las condiciones del suelo y a sus perturbaciones, en estudios comparativos donde se evalúan estas variables en un mismo suelo se puede sugerir que diferencias en el número de colonias y clases de éstas pueden indicar cambios en la composición y densidad de microorganismos debido a las condiciones prevalecientes o a la perturbación (Kennedy y Stubbs, 2006).

V. Autoevaluación

1. ¿Qué papel tiene la microflora en los suelos?
2. ¿Qué es un medio de cultivo?
3. ¿Qué tipos de medios de cultivo existen de acuerdo con su consistencia?
4. ¿Cuál es la diferencia entre un medio de cultivo selectivo y uno no selectivo?
5. ¿Qué características se consideran para la descripción de las colonias microbianas?

Extracción de esporas de hongos micorrízicos arbusculares

Dainiz Hernández y Hernández

En este capítulo se espera que el estudiante reconozca la importancia de extraer y aislar esporas de hongos micorrízicos del suelo y aprenda un método para realizar su extracción y medir su concentración en una muestra de suelo.

I. Introducción

Las **micorrizas** son una **simbiosis** o asociación simbiótica entre hongos y las raíces de las plantas, mediante las cuales los hongos proveen de nutrientes a las plantas a cambio de carbohidratos (Barea et al., 2008.). La asociación entre plantas y hongos micorrízicos se ha encontrado en la mayoría de las familias de plantas y en todos los biomas terrestres, por lo que se consideran cosmopolitas (Kivlin et al., 2011). Los hongos que son parte de esta simbiosis pueden ser macro o microscópicos, y se encuentran clasificados en cuatro divisiones del reino fungi: ascomicetes, basidiomicetes, zigomicetes y glomeromicetes (Smith y Read, 2008). Se han descrito seis tipos de micorrizas: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropoide y orquidoide, siendo la primera la más frecuente en las especies de plantas (Smith y Read, 2008).

La importancia de la interacción entre las plantas y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) para el crecimiento de las plantas es ampliamente reconocida (Smith y Read, 2008; Marschner, 2008). En las primeras décadas dedicadas al estudio de los HMA, Mosse (1959), Nicolson (1959) y otros, notaron que las hifas de los estos hongos estaban presentes abundantemente en la superficie de las raíces de las plantas de muchos hábitats y su profusa ocurrencia también era evidente cuando se examinaban directamente los suelos asociados a las plantas (Warcup, 1957). A pesar de que se sabía que los HMA beneficiaban significativamente a las plantas durante su crecimiento, hasta 1963 sólo se habían hecho observaciones directas sobre el suelo y las raíces e intentos por aislarlos de las raíces colonizadas, pero aún no se reconocía a las esporas del suelo como fuente de inóculo de los HMA. Desde entonces muchos autores (Gerdemann y Nicholson, 1963; Mosse y Jones, 1968; Sutton y Barron, 1972; Smith y Skipper, 1979; Tommerup y Kidby, 1979) han desarrollado y mejorado las técnicas para la extracción y aislamiento de esporas, las cuales han sido una herramienta

Las micorrizas por lo general, pero no siempre, mejoran la absorción total de fósforo y el crecimiento de la planta. La planta recompensa a los hongos por este servicio compartiendo entre el 5 y el 20% de sus productos de la fotosíntesis.

importante en el estudio de la interacción entre las plantas y los HMA. Por ejemplo, a través del análisis morfológico y/o genético de las esporas se ha podido identificar una amplia variedad de especies de HMA que interactúan con distintas especies de plantas en una amplia gama de ecosistemas (Davison et al., 2015). También, con el aislamiento de esporas se han llevado a cabo múltiples experimentos de inoculación de plantas con HMA en suelos estériles (consorcios o una sola especie) en ambientes controlados, o bien para medir el potencial de micorrización de las esporas que se encuentran en alícuotas de suelo provenientes de ambientes naturales (Köhl et al., 2016).

En esta práctica se aprenderá un método de extracción y aislamiento de esporas con sacarosa, basada en las técnicas desarrolladas por Gerdemann y Nicolson (1963), Mosse y Jones (1968), adaptadas por Sánchez de Prager et al., 2010.

Las esporas de los hongos micorrízicos exhiben diferencias morfológicas entre especies en tamaño, color, forma, ornamentaciones y textura, por lo que son usadas para analizar la diversidad y composición de estos hongos en el suelo.

II. Método

2.1. Principio

La metodología consiste en la separación de las esporas de hongos micorrízicos de partículas minerales del suelo a través de un tamizado húmedo por cribas de diferente tamaño, y su extracción por medio de flotación en una solución de sacarosa (Sánchez de Prager et al., 2010). Las esporas son colocadas en una caja de Petri para su identificación y conteo con un microscopio estereoscópico. La concentración de esporas se expresa en número de esporas por masa de suelo seco.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|--|
| Juego de tamices con tamaños de malla de 2 mm (No. 10), 450 μm (No. 35), 120 μm (No. 125) y 40 μm (No. 235) |
| Probeta de 1 L |
| Vaso de precipitados de 2 L |
| Bandejas de plástico |
| Piseta con agua destilada |
| Tubos de centrifuga de 50 ml |
| Jeringa de 60 ml con punta removible (uso veterinario) |
| Jeringa 3 ml con punta removible |
| Manguera plástica flexible de 1/8 pulgada de diámetro (10-15 cm longitud) |
| Pipetas de Pasteur 1 ml |
| Espátula con punta fina |

| |
|--|
| Cajas de Petri |
| Cajas de Petri cuadriculadas (5 mm x 5 mm) |
| Contador manual |
| Equipos |
| Micropipeta 200 μ l |
| Centrífuga |
| Estereoscopio |
| Balanza digital |
| Plancha caliente con agitador magnético |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|--|
| Agua destilada estéril | N. A. |
| Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) al 70% (azúcar de mesa) | Disolver 700 g de sacarosa en 1 L de agua destilada. Disolver lentamente la sacarosa en 400 ml de agua destilada dentro de un vaso de precipitados de 2 L sobre el agitador magnético con plancha caliente. Si la sacarosa se precipita, adicionar un volumen extra de agua hasta que el precipitado se haya disuelto. Se incorpora a la solución el volumen restante de agua. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Extracción de esporas

- a) A una jeringa de 60 ml, cámbiale la punta de punción por una manguera plástica flexible de 1/8 de pulgada de diámetro y 10-15 cm de longitud, para usarla en la dosificación de la solución de sacarosa y la extracción de las esporas.
- b) Toma dos muestras de suelo de 20 g. Con una de ellas determina la humedad por gravimetría siguiendo la metodología que se presenta en el capítulo 5. Tamiza la segunda muestra por un tamiz de 2 mm sobre una bandeja de plástico. Posteriormente, tamiza por los otros tamices superpuestos con un arreglo en tamaño descendente (450-120-40 μ m) con la ayuda de agua corriente en la tarja. Este tamizado se realiza para separar las partículas del suelo y las esporas por tamaño, así como para deshacerse del material con menor tamaño.
- c) Decanta en tubos de centrífuga de 50 ml el material que haya quedado en las mallas de los tamices de 120 y 40 μ m. Esto lo puedes hacer con la ayuda de la piseta con agua destilada y la espátula de

punta fina, teniendo cuidado de que el volumen de la muestra con el agua no sobrepase los 25 ml en el tubo. Finalmente, homogeniza la muestra con agitación manual o con la ayuda de la espátula de punta fina.

- d) Con la jeringa para sacarosa toma aproximadamente 40 ml de la solución de sacarosa al 70% y, cuando la muestra deje de moverse después de haberse homogeneizado, adiciona a presión al fondo del tubo hasta llegar a 45-50 ml de volumen total. Si se procesa más de una muestra, el tubo de la jeringa deberá enjuagarse superficialmente en cada aplicación de sacarosa.
- e) Equilibra el volumen de los tubos de centrifuga con agua destilada, mediante su adición con la ayuda de un gotero o pipeta de Pasteur.
- f) Centrifuga los tubos a 3,350 rpm por 4 min.
- g) Observarás 3 fases en el tubo: agua, sacarosa y suelo. Con la jeringa, extrae la fase de la sacarosa que ha quedado en la parte intermedia de los tubos. Principalmente se busca rescatar el material contenido en el límite sacarosa-agua, donde se acumulan las esporas, pero se recomienda extraer toda la fase hasta dejar unidas las fases agua-suelo.
- h) Coloca la solución extraída de los tubos en un tamiz de 40 μm y enjuaga con agua corriente hasta eliminar toda la solución de sacarosa. Con la ayuda de una piseta, transfiere el material remanente en el tamiz a una caja de Petri.
- i) Coloca la caja de Petri con el material extraído bajo el estereoscopio y con la punta de punción de la jeringa de 3 ml separa las esporas y colócalas en otra caja de Petri para su análisis.

2.4.2. *Conteo de esporas*

- a) Transfiere las esporas a la caja de Petri cuadrículada. Esto se puede hacer a través de un lavado con una cantidad reducida de agua para reducir el movimiento de las esporas.
- b) En el estereoscopio revisa cada cuadro de la caja de Petri y toma nota de cuántas esporas hay con ayuda de un contador manual. Es recomendable que las esporas se agrupen por morfotipos, y sean contabilizadas también de esta forma para que posteriormente se puedan calcular otros índices, tales como la abundancia relativa de morfotipos e índices de diversidad, como el de Shannon-Weaver (H') y Simpson (D_s) descritos en el capítulo 11 del presente manual.

III. Cálculos

Para determinar la concentración de esporas en el suelo se usa la siguiente ecuación (Sánchez de Prager et al., 2010) (14.1):

$$\text{Concentracion de esporas} = \left(\frac{\text{No. de esporas}}{P_{\text{muestra}} * \left(\frac{Ps}{Ph} \right)} \right) * 100$$

Donde:

Concentración de esporas = No. de esporas en 100 g suelo

No. de esporas = número de esporas registradas

P_{muestra} = peso fresco de la muestra de suelo de donde se extraen las esporas (g)

Ph = peso fresco de la muestra usada para determinar la humedad (g)

Ps = peso seco de la muestra usada para determinar la humedad (g)

IV. Interpretación

Dado que la mayoría de los HMA producen sus esporas en el suelo y las esporas son una de las fuentes de propagación e infección de los hongos, la cuantificación de las esporas permite inferir parte del potencial de propagación de los HMA; entre mayor cantidad de esporas mayor sería dicho potencial (Hernández-Cuevas et al., 2008). La abundancia y distribución de morfotipos de esporas puede ser un indicador de la afinidad de algún hongo con una especie vegetal si constantemente se encuentra el morfotipo en la rizósfera de la planta, aunque esto debe ser corroborado con otros métodos, como los genéticos (Dalpé y Hamel, 2008).

Por otra parte, las esporas son la principal estructura para la determinación taxonómica de los HMA, por lo que la cuantificación de los diferentes morfotipos de esporas permite estimar la diversidad de estos hongos en el suelo. No obstante, si el objetivo de la aplicación del presente método es analizar la diversidad de los HMA, es recomendable hacer muestreos estacionales a lo largo del año debido a las fluctuaciones temporales en la producción de esporas de las diferentes especies de hongos (Hernández-Cuevas et al., 2008).

Los hongos micorrízicos se pueden propagar a partir de las esporas, pero también a partir del micelio fúngico o hifas del mismo.

V. Autoevaluación

1. ¿Qué son las micorrizas?
2. ¿Qué divisiones de hongos pueden formar micorrizas?
3. ¿Qué tipos de micorrizas existen y cuál es la que es más ampliamente extendida?
4. ¿Para qué puede servir aislar a las esporas de los hongos micorrízicos?
5. ¿Cómo se pueden extraer las esporas de los hongos micorrízicos del suelo?

Tinción de raíces para la observación y conteo de hongos micorrízicos arbusculares

Dainiz Hernández y Hernández

En este capítulo se espera que el estudiante conozca las diferentes estructuras de los hongos micorrízicos arbusculares y aprenda a cuantificar el nivel de colonización del micelio fúngico en las raíces de las plantas mediante un método de tinción.

I. Introducción

El establecimiento de la simbiosis micorrízica entre plantas y hongos es considerada una de las estrategias más exitosas y utilizadas por las plantas para maximizar el acceso de las raíces al fósforo inorgánico (Pi), ya que a través del micelio externo de la micorriza se explora un volumen de suelo más extenso y alejado de la rizosfera, la cual es considerada una zona de agotamiento de Pi (Smith y Read, 2008).

El tipo de micorriza más extendido en la naturaleza es la micorriza arbuscular, registrada en más del 80% de las familias de plantas de todos los ecosistemas terrestres (Smith y Read, 2008). Las estructuras características de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son: micelio extrarradical, hifas intrarradicales, arbuscúlos, vesículas, y coils (Smith y Smith, 1997). El micelio de los HMA puede estar fuera de la raíz (extrarradical) o dentro de ésta (intrarradical). Los arbuscúlos son ramificaciones de las hifas del hongo producidas entre la membrana y la pared celular de las células de la raíz, cercanas a los haces vasculares; su función es el intercambio de materiales entre el hongo y la planta. Las vesículas son estructuras esféricas que produce el hongo entre las células y las plantas con función de almacenamiento. El micelio puede tener una forma lineal o de bucle dentro de las raíces, en cuyo caso se denomina coil (Brundrett, 2004). Otro tipo de interacción micorrízica lo comprenden las ectomicorrizas, que se caracterizan por ser epidérmica o cortical, es decir el hongo no penetra entre las células de las raíces (Brundrett, 2004). Las ectomicorrizas se caracterizan por formar un intrincado conjunto de hifas sobre la epidermis de la raíz conocido como red de Hartig, en la cual parece realizarse el intercambio de sustancias entre el hongo y la planta (Brundrett, 2004).

Los hongos micorrízicos no solo pueden mejorar la obtención de Pi por las plantas, sino también la obtención de agua y la de otros nutrientes que tienen baja movilidad o se encuentran en muy baja concentración en el suelo, como K, Zn y Mo.

Los hongos micorrízicos no penetran dentro de las células de las plantas, solo penetran entre las células del córtex de las raíces, donde pueden producir hifas, arbuscúlos, vesículas y coils e incluso esporas.

Muchos estudios ecológicos relacionados con los HMA se basan en la observación y cuantificación de sus estructuras en distintas condiciones, tanto en campo como en invernadero. El parámetro que se calcula para evaluar cuantitativamente la intensidad de esta interacción es el porcentaje de colonización micorrízica, el cual dependerá de muchos factores, tales como las especies de hongos, las especies de plantas hospederas, la morfología de las raíces, las concentraciones de Pi en el suelo, entre otras (Smith y Read, 2008; Amijee et al., 1989). Y aunque propiamente no aporta información cualitativa acerca de la simbiosis, sí nos puede servir de base para formular hipótesis acerca de la efectividad de ésta en diferentes escenarios de disponibilidad de Pi. A partir de la observación de dichas estructuras también se puede estudiar la dinámica temporal y espacial de la interacción, así como la fenología o ciclo de vida de los HMA. Sin embargo, la observación de estas estructuras no permite determinar las especies de HMA que colonizan las raíces. En la presente práctica se describe el proceso para realizar un muestreo de raíces y un método de observación de las estructuras fúngicas mediante su tinción con azul de tripano basado en el método desarrollado por Phillips y Hayman (1970). Asimismo, se describe el método de conteo y determinación del porcentaje de colonización.

II. Método

2.1. Principio

Para detectar y cuantificar la presencia de estructuras fúngicas en las raíces de las plantas, es necesario recurrir a métodos de tinción, ya que la observación directa suele ser insuficiente (Dalpé y Hamel, 2008). El método descrito aquí está basado en Phillips y Hayman (1970), e implica la aclaración de las raíces con hidróxido de potasio (KOH) y la tinción de las estructuras fúngicas con azul de tripano. El conteo de estructuras y la determinación del porcentaje de colonización se llevan a cabo por medio de observaciones sistemáticas de fragmentos de raíces con el uso de un microscopio óptico.

La identificación de las especies o morfoespecies de hongos micorrízicos a partir de rasgos morfológicos se hace a través de la observación de las esporas (ver capítulo 14).

2.2. Material y equipos

| Materiales | |
|-------------|---|
| Campo | Bolsas de plástico |
| Campo | Tijeras |
| Campo | Plumón marcador |
| Campo | Etiquetas |
| Laboratorio | Tubos de centrifuga o vasos de plástico herméticos de 50-100 ml |
| Laboratorio | Tubos Falcon 80-100 ml |

| Laboratorio | Coladeras |
|-------------|--|
| Laboratorio | Pinzas de cirujano |
| Laboratorio | Portaobjetos |
| Laboratorio | Cubreobjetos |
| Equipos | |
| Campo | Herramientas de jardinería (pala, pico, pala pequeña de jardinero, tijeras de corte) |
| Laboratorio | Microscopio óptico |
| Laboratorio | Baño maría |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|---|
| Agua destilada | N. A. |
| Alcohol etílico al 70% (comercial) o ácido acético | N. A. |
| Hidróxido de potasio (KOH) al 10% (p/v) | Mezclar 10 g de KOH en 100 ml de agua. |
| Ácido clorhídrico (HCl) al 10% (v/v) | Mezclar 10 ml de HCl con 90 ml de agua destilada. |
| Agua oxigenada (H ₂ O ₂) al 0.5% (v/v) (comercial) | N. A. |
| Ácido láctico | N. A. |
| Glicerina | N. A. |
| Lactoglicerol (1:1:1; v/v/v): ácido láctico, glicerina, agua destilada | Hacer una mezcla de 10 ml de ácido láctico con 10 ml de glicerina y 10 ml de agua. |
| Azul de tripano en lactoglicerol al 0.05% (p/v) | Mezclar 0.05 g de azul de tripano en 100 ml de lactoglicerol (almacenar en frasco ámbar). |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Procesamiento de muestras en campo

Después de haber seleccionado las plantas a muestrear, es recomendable aflojar la tierra con el pico antes de proceder a levantar la planta junto con el sistema radicular. Posteriormente, con ayuda de la pala y pico procede a desenterrar las raíces, teniendo cuidado de no arrancarlas súbitamente, ya que se puede perder mucho material que quedará enterrado en el suelo. Una vez que se hayan desenterrado las raíces usa las herramientas de jardinería para dejarlas completamente expuestas, cuidando siempre de no causarles daño ni segmentarlas. En el caso de

arbustos y árboles, es recomendable cavar cerca del tronco, si las raíces principales lo permiten, y buscar conglomerados de raíces finas para poder obtener de ahí las muestras.

Las raíces se recolectan con los siguientes criterios de importancia:

- a) Raíces vivas. Esto se puede ver cuando las raíces contienen humedad y son parte de la raíz principal o de raíces más gruesas. No es recomendable coleccionar segmentos cortos de raíces que están en el suelo separadas de la planta, ya que es muy probable que formen parte de las raíces de recambio, y lo que se observe después de la tinción podría no representar la colonización efectiva de los HMA en dicha planta hospedera.
- b) Que sean raíces delgadas (aproximadamente 1 mm de diámetro). Las raíces un poco más gruesas también pueden servir para la cuantificación, sólo que es difícil conservar las preparaciones que contienen material grueso y además se expone el material al ambiente, ya que el cubreobjetos no cumple su función adecuadamente con este tipo de raíces.
- c) Durante la recolección, las raíces deben conservarse inmediatamente en alcohol etílico al 70% o ácido acético en tubos Falcon de 50 ml o en recipientes herméticos, para evitar que las estructuras de los HMA se degraden.

2.4.2. Procesamiento de muestras en laboratorio

- a) Lava cada muestra de raíces por separado con agua corriente para remover residuos de suelo y la solución de conservación; debes llevar este paso a cabo con la ayuda de una coladera.
- b) Posteriormente, corta las raíces en segmentos no menores a 2 cm, para poder procesarlas de forma más efectiva en la tinción, y enjuágalas nuevamente con agua destilada.
- c) Coloca las raíces segmentadas en tubos Falcon de 80 ml y adicionales KOH al 10% hasta cubrir todo el material. Posteriormente, los tubos son puestos a baño maría a 75 °C durante 20 min. Este paso tiene la función de eliminar los pigmentos de los tejidos radiculares. El KOH puede causar irritación o quemaduras en la piel por lo que es importante evitar tener contacto directo con él; en dado caso lavar con agua de la llave de manera abundante en la tarja.
- d) Enjuaga las muestras con agua destilada en las coladeras y devuélvelas a los tubos Falcon de 80 ml. Agrega H₂O₂ al 0.5% durante 5 min a temperatura ambiente (TA), para terminar el proceso de despigmentación de una forma menos disruptiva con las raíces.
- e) Vuelve a enjuagar las raíces con agua destilada en las coladeras y devuélvelas a los tubos Falcon de 80 ml, para después cubrir las completamente con HCl al 10% durante 3 min a TA para neutralizar los residuos de KOH.
- f) Enjuaga las raíces por una última vez con agua destilada en las coladeras y colócalas en los tubos Falcon de 80 ml nuevamente; agrega la solución de azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol; y calienta

en baño maría a 65 °C por 10 min para poder lograr la tinción. El azul de tripano es cancerígeno por lo que se debe evitar que tenga contacto directo con la piel. En caso de que esto suceda, lava con agua de la llave de manera abundante.

- g) Por último, remueve el exceso de colorante enjuagando con agua en una coladera, conserva las muestras teñidas en lactoglicerol dentro de tubos Falcon o recipientes herméticos.

2.4.3 Montaje de raíces en los portaobjetos, observación y conteo al microscopio

- a) Corta las raíces teñidas con las tijeras en segmentos aún más pequeños, de aproximadamente 1 cm. De cada muestra toma 20 segmentos de raíz para colocarlas en forma vertical en un portaobjetos, por duplicado, es decir, 40 segmentos por muestra repartidos en dos portaobjetos. Una vez colocados los segmentos de raíces, agrega una o dos gotas de lactoglicerol sobre éstos para asegurar que el cubreobjetos quede lo más fijo posible.
- b) Utilizando un microscopio óptico compuesto con un objetivo de 10x, realiza un conteo de presencia de las estructuras estableciendo 5 líneas horizontales imaginarias sobre el portaobjetos. Coloca el objetivo del microscopio sobre el primer segmento de raíz de la izquierda y recorre el portaobjetos de izquierda a derecha; cuando te encuentres cada uno de los segmentos de raíz, realiza el conteo de las estructuras, anotando sólo la presencia de la estructura; es decir, si en ese campo visual se observan, por ejemplo, tres vesículas, dos arbuscúlos e hifas, se anotarán en una hoja una hifa, un arbuscúlo y una vesícula. Al llegar al segmento 20 de la línea imaginaria superior, comienza el conteo de la segunda línea imaginaria; recorre hacia abajo el objetivo del microscopio sobre el segmento 20 para iniciar el conteo de la segunda línea de derecha a izquierda. Por lo tanto, contabiliza la tercera línea de izquierda a derecha y por debajo de la segunda línea, y así sucesivamente. La tercera línea debería estar colocada más o menos a la mitad de los segmentos de raíces, para que las líneas 1, 2, 4 y 5 queden repartidas equitativamente por encima y debajo de la línea tres. En la tabla siguiente se presenta un formato para el registro de los conteos de estructuras.

Formato para el registro de estructuras fúngicas.

| Campo Visual | Micelio interno | Arbuscúlo | Vesícula | Coil | Micelio externo | Total de Estructuras |
|--------------|-----------------|-----------|----------|------|-----------------|----------------------|
| 1 | 1 | | 1 | | | 2 |
| ... | | | | | | |
| 100 | | | | | | |

- c) Este método de conteo está enfocado en el porcentaje de presencia de las estructuras. Para poder contabilizar la longitud de las hifas, por ejemplo, se necesita una rejilla cuadrículada (1 mm² con aper-

tura de 100 μm) para el microscopio, en donde se cuenta el número de intersecciones de las hifas con las líneas de la cuadrícula; en este caso, las estructuras (vesículas, coils y arbusculos) que hay dentro de la cuadrícula son las únicas que se contabiliza su presencia o ausencia.

III. Cálculos

Determinación del porcentaje de colonización y longitud de hifas

- a) Para obtener el porcentaje de colonización de los segmentos de raíces en cada portaobjetos, suma las incidencias de cada una de las estructuras en cada uno de los campos visuales (CV) y calcula con la siguiente ecuación (15.1):

$$\text{Colonización } i = \frac{\text{Observaciones } i}{\text{Total de CV}} * 100$$

Donde:

Colonización i = porcentaje de colonización de la estructura i (%)
 Observaciones i = número total de observaciones de la estructura i
 Total CV = número total de campos visuales

Esto indicará el porcentaje de colonización de hifas, vesículas, arbusculos y coils por separado. Es probable que en algunos campos visuales no observes ninguna estructura, en algunas sólo se encontrarán hifas, hifas con vesículas o hifas con arbusculos. Entonces para obtener el total de colonización de todas las estructuras, realiza el siguiente cálculo (15.2):

$$\text{Colonización total} = \frac{\text{Total de CV} - \text{CV vacíos}}{\text{Total de CV}} * 100$$

Donde:

Colonización total = porcentaje de colonización total (%)
 Total CV = número total de campos visuales
 CV vacíos = campos visuales sin estructuras

- b) Para determinar la longitud de hifas (en mm), en el caso de contar con la rejilla cuadrículada, utiliza la siguiente fórmula basada en la aguja de Buffon (15.3) (Schroeder, 1974):

$$LH (mm) = \frac{(I * \pi * 100)}{4}$$

Donde:

LH = longitud de hifas (mm)
 I = número de intersecciones de las hifas con las líneas de la rejilla

IV. Interpretación

La presencia de las estructuras de los HMA en las raíces es un indicador de la existencia de la interacción micorrízica y del estado de la interacción. El porcentaje de hifas encontrado es un indicador del grado de colonización de las raíces, a mayor porcentaje de hifas mayor grado de colonización (Brundrett, 2004). El grado de colonización de las raíces puede variar temporalmente en las especies de plantas por lo que hay que considerar esto al interpretar los resultados (Dalpé y Hamel, 2008). Asimismo, resulta importante mencionar que el grado de colonización no puede relacionarse directamente con un beneficio para las plantas debido a que ello depende también del costo que tiene para las plantas la interacción con el hongo (es decir, la micorriza normalmente debe analizarse en términos de una relación costo/beneficio) (Brundrett, 2004).

La presencia de arbuscúlos permite definir la presencia de micorrizas arbusculares de hongos del filo Glomeromycota, de otras asociaciones endofíticas (Brundrett, 2004). Los arbuscúlos son estructuras que producen los hongos para el intercambio de materiales con la planta, principalmente Pi y carbohidratos, de tal forma que su presencia y su abundancia es un indicador de la actividad de la interacción (Harrison, 1997; Grace et al., 2009). No obstante, los arbuscúlos son estructuras efímeras (con tiempos de vida entre 2 y 15 días) y a menudo ausentes o difíciles de ver en raíces colectadas en campo (Brundrett, 2004).

La presencia de coils puede ayudar a distinguir entre especies de hongos arbusculares, ya que no todas las especies de hongos producen estas estructuras y solo tienen hifas lineales (Brundrett, 2004). Los coils intracelulares pueden transferir Pi a las células de las plantas, por lo que su presencia también puede ser indicativa de la actividad de la micorriza en la transferencia de Pi (Grace et al., 2009).

Las vesículas son estructuras de almacenamiento de diferentes materiales, incluyendo lípidos, y su presencia suele ocurrir en conjunción con la presencia de arbuscúlos (Harrison, 1997). Las vesículas no las producen todas las especies de hongos arbusculares, y entre las especies que las generan, su producción puede ser variable, por lo que la interpretación de su presencia puede no ser clara, y requiere de muestreos más intensivos a una sola colecta (Brundrett, 2004).

V. Autoevaluación

1. ¿Qué beneficio tienen las plantas de su asociación con hongos micorrízicos?
2. ¿Qué estructuras presentan los hongos micorrízicos arbusculares?
3. ¿Qué funciones desempeñan los arbuscúlos y las vesículas de los hongos arbusculares?
4. ¿De qué factores depende el grado de colonización de las raíces por hongos micorrízicos?
5. ¿De qué puede ser indicativo el grado de colonización de las raíces por hongos micorrízicos?

IV. Procesos microbiológicos

En el suelo se llevan a cabo una serie de procesos biogeoquímicos de transformación de materia y energía fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Osman, 2013), uno de ellos es la descomposición de la materia orgánica. Se estima que entre el 80 y 90% de la productividad primaria neta anual en los ecosistemas terrestres es transferida de la vegetación al suelo a través de la producción de hojarasca y el recambio de raíces (Horwath, 2015). Estos residuos de las plantas, en conjunto con los detritos de los animales, son descompuestos o degradados por los organismos heterótrofos del suelo, los cuales a través de ello obtienen la energía y nutrientes necesarios para su crecimiento, a la vez liberan formas químicas de nutrientes que están disponibles para las plantas. Así, la descomposición de los residuos orgánicos de plantas y animales es considerada como un proceso fundamental en el flujo de energía y en el ciclaje de nutrientes, el cual determina la **productividad primaria** de los ecosistemas y el almacenamiento de carbono en los suelos (Swift et al., 1979; Chapin III et al., 2014). La descomposición de la materia orgánica es afectada principalmente por la cantidad y composición química de los residuos orgánicos, la composición y diversidad de los microorganismos del suelo, el clima y las características físicas y químicas del suelo (Chapin III et al., 2014), por lo que la interacción de estos factores determina la tasa de descomposición en un sitio y momento dado. Para evaluar este proceso y la actividad de los microorganismos descomponedores en suelo, se han usado como indicadores a la respiración del suelo y la actividad de **enzimas extracelulares**, dada la relativa facilidad de medición de estas propiedades y a su alta sensibilidad a perturbaciones o cambios en las condiciones del suelo (Arshad y Martin, 2002; Burns et al., 2013). En esta sección se presentan un par de metodologías encaminadas a estudiar estas propiedades.



Respiración del suelo

16

Carlos Antonio Anaya Merchant
Neftalí Razo Pérez

En este capítulo se espera que el alumno comprenda el proceso de respiración del suelo y aprenda una metodología para determinarla en el laboratorio mediante incubaciones aeróbicas de suelo.

I. Introducción

La respiración es un proceso bioquímico por medio del cual los organismos oxidan los carbohidratos para obtener la energía que requieren para su crecimiento, mantenimiento y reproducción, y en el cual se generan como subproductos dióxido de carbono (CO_2) y agua (Chapin III et al., 2014). La respiración se ha clasificado como autotrófica, cuando la desarrollan organismos autótrofos (e.g. plantas), y heterotrófica, cuando la desarrollan organismos heterótrofos (e.g. animales) (Houghton, 2009).

Puede ser estudiada en diferentes niveles de organización, incluyendo la célula, los organismos y el ecosistema, así como en componentes de estos, para lo cual se usan métodos adecuados para cada uno de los niveles (Chapin III et al., 2014). La respiración del suelo se refiere a la emisión de CO_2 como producto de la actividad metabólica de los organismos del suelo (Schlesinger y Bernhardt, 2013). Esta emisión resulta de la suma de las actividades de las raíces de las plantas y sus organismos asociados en la rizósfera, la actividad de la microflora del suelo (i.e. bacterias y hongos) y la actividad de la fauna del suelo (Hanson et al., 2000).

La respiración de los suelos es un componente importante del balance de carbono, tanto a nivel del ecosistema como a nivel global, estimándose que este flujo excede a todos los otros intercambios de carbono atmósfera-ecosistemas terrestres, con la excepción de la fotosíntesis o productividad primaria bruta (Raich y Schlesinger, 1992). Dada la magnitud del flujo de CO_2 del suelo a la atmósfera por la respiración y del gran almacén de carbono orgánico potencialmente mineralizable en los suelos, se sugiere que un pequeño aumento en las emisiones de CO_2 del suelo en respuesta a una perturbación, como un cambio ambiental, tiene el potencial de exacerbar el aumento de la concentración de carbono en la atmósfera y proporcionar una retroalimentación positiva al calentamiento global (Bradford et al., 2016; Melillo et al., 2017).

La respiración del suelo depende de un conjunto de factores que actúan simultáneamente, incluyendo: la temperatura y humedad del suelo, la disponibilidad de oxígeno, la cantidad y calidad química de la materia orgánica y el tamaño y composición de la comunidad de organismos del suelo, entre otros (Raich y Tufekciogul, 2000). La interacción de estos factores determina los patrones temporales y espaciales de la respiración.

La respiración del suelo puede medirse en campo y en laboratorio (Bekku et al., 1997). En campo, generalmente se mide cubriendo una superficie específica del suelo con una cámara hermética a los gases durante un tiempo específico, en el que bajo condiciones ambientales se determina el flujo de CO_2 (Hollan et al., 1999; Pell et al., 2005). Las mediciones de campo son la única forma de evaluar la respiración en condiciones naturales, y conjuntan la suma de la respiración de todos los organismos (incluidas las raíces), por lo que a menudo resultan en grandes variaciones espaciales y temporales en el flujo de CO_2 . Por su parte, en laboratorio, la respiración normalmente se evalúa incubando una masa de suelo por un tiempo determinado en condiciones de temperatura y humedad controladas. Aunque las mediciones de respiración realizadas mediante incubaciones de suelo en laboratorio tienen poca semejanza con las mediciones realizadas en condiciones naturales, son más fáciles de manejar, permiten realizar determinaciones en condiciones estandarizadas, y pueden ser usadas para realizar experimentos con diseños específicos para responder preguntas concretas (Pell et al., 2005).

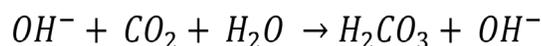
La respiración del suelo suele incrementar con la temperatura, por lo que se espera que el calentamiento global promueva un incremento de la respiración, especialmente en los ecosistemas boreales y árticos donde la temperatura limita la actividad microbiana y la descomposición de la materia orgánica.

II. Método

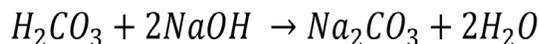
2.1. Principio

El método consiste en incubar una muestra de suelo o mantillo por un tiempo determinado dentro de un frasco herméticamente cerrado y bajo condiciones de temperatura, humedad y luminosidad controladas. El CO_2 respirado por la biota del suelo es absorbido por una solución alcalina de hidróxido de sodio (NaOH) colocada al interior del frasco, y la cantidad de CO_2 respirado se estima a través de la determinación del cambio en la concentración del NaOH después de la incubación (Zibilske, 1994), como se detalla a continuación:

En un medio alcalino, el CO_2 producto de la respiración de los microorganismos reacciona con los iones hidróxido (OH^-) y forma ácido carbónico (16.1):



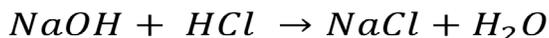
El ácido carbónico es inestable en el medio alcalino, por lo que rápidamente reacciona con el hidróxido y forma carbonato de sodio (16.2):



Debido a esta reacción del CO_2 con el NaOH, la concentración del NaOH del vial disminuye. De esta forma, a partir del cambio en la molaridad del NaOH incubado se puede determinar cuántos moles de éste reaccionaron con el CO_2 y, por lo tanto, cuanto CO_2 fue liberado por

los microorganismos durante la incubación. De acuerdo con las fórmulas 1 y 2, una unidad de CO_2 produce una unidad de ácido carbónico, y una unidad de ácido carbónico reacciona con dos unidades de NaOH para formar una unidad de carbonato de sodio; por lo tanto, hay una relación 2:1 entre el NaOH y el CO_2 para formar una unidad de carbonato de sodio.

La concentración del NaOH al inicio y el final de la incubación puede determinarse mediante su titulación con HCl, usando fenolftaleína como indicador. La reacción es la siguiente (16.3):



Como se puede apreciar, ésta es una reacción 1:1, un equivalente de NaOH es neutralizado por un equivalente de HCl.

2.2. Material y equipos

| Materiales |
|---|
| Frascos de 1 L con tapa hermética (uno por muestra más blancos) |
| Viales de 15-20 ml con tapa hermética (uno por frasco de 1 L) |
| Pipeta serológica de 10 ml |
| Matraz volumétrico de 500 ml |
| Vaso de precipitados de 250 ml |
| Vaso de precipitados de 500 ml |
| Gotero con fenolftaleína |
| Bureta de 50 ml |
| Pinzas para bureta |
| Soporte universal |
| Matraces de Erlenmeyer de 50 ml (uno por muestra más blancos) |
| Tamiz de 2 mm (No. 10) |
| Tubo de PVC de 5 cm de diámetro por 10 cm de largo |
| Equipos |
| Balanza analítica |
| Campana de extracción |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|-------------------------------|---|
| Agua destilada estéril | N. A. |
| Hidróxido de sodio (NaOH) 1 M | Mezclar 40 g de NaOH puro en 1 L de agua destilada en un matraz aforado. |
| Ácido clorhídrico (HCl) 1 M | Mezclar 83.49 ml de HCl en 1 L de agua destilada. Esta cantidad fue determinada para un HCl con 37% de pureza |

| | |
|--|---|
| Cloruro de bario (BaCl_2) 1.5 N | Disolver 156.15 g de BaCl_2 puro en 1 L de agua destilada. |
| Alcohol etílico al 70% | N. A. |
| Fenolftaleína al 1% (como indicador) | Disolver 1 g de fenolftaleína en 100 ml de alcohol etílico. |

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

La respiración puede medirse en muestras de suelo, **mantillo**, material orgánico o mezclas de estos. Las muestras del suelo deben ser colectadas de una capa y horizonte del suelo particular con la ayuda de una pala de jardinero o un nucleador de suelos, depositadas en una bolsa negra y resguardadas dentro de una hielera a la sombra. En laboratorio, las muestras deben ser conservadas en refrigeración a 10 °C para disminuir cambios en la comunidad de microorganismos. Asimismo, las muestras deben ser procesadas e incubadas poco tiempo después de ser colectadas para que la comunidad microbiana no se altere drásticamente por su almacenamiento. Si las muestras de suelo están muy húmedas, se pueden secar a la sombra por un tiempo determinado. Las muestras de suelo normalmente son cribadas por un tamiz de 2 mm antes de determinar la respiración, aunque también se puede hacer la determinación con núcleos de suelo sin perturbar (Pell et al., 2005).

El procedimiento incluye dos etapas, la primera consiste en incubar la muestra de suelo dentro de un frasco con una solución de hidróxido de sodio (NaOH), a temperatura ambiente o en incubadora, y la segunda consiste en determinar la cantidad de CO_2 respirado por los organismos del suelo durante el periodo de incubación.

Nota: En caso de que la incubación se realice por más de tres días se pueden incluir etapas intermedias para la medición de la evolución de CO_2 en el tiempo.

2.4.1. Incubación

- a) Incuba el suelo en un tubo de PVC, previamente cubierto en uno de los extremos con una malla con diámetro de poro de 0.5 mm. Pesa 100 g de suelo fresco y colócalos en el interior del tubo de PVC, evitando que haya pérdidas. Posteriormente, humedece el suelo lentamente hasta capacidad de campo, y deja reposar a temperatura ambiente por un día o más para que la actividad de los microorganismos se estabilice. Pell et al. (2005) sugieren humedecer el suelo y dejar reposar por 10 días para que la tasa de mineralización de CO_2 se estabilice. Tienes que evitar saturar el suelo con agua, ya que en los suelos saturados disminuye la difusión del oxígeno y se crea un ambiente **anaeróbico**. En caso de incubar mantillo u otro material orgánico, debes usar una menor cantidad del mismo. Por ejemplo, para hojas de plantas, la cantidad a incubar puede variar

entre 1 o 3 gr de muestra, dependiendo de su masa foliar específica (g hoja / cm² de hoja); si ésta es pequeña se recomienda usar una cantidad de material pequeña (1 g), y si es alta se puede usar una cantidad mayor (2 g). Previo a la incubación, las hojas se pueden introducir en bolsas de malla con diámetro de poro de 0.5 mm, con dimensiones aproximadas de 5 cm x 10 cm, humedecer, y dejar reposar al aire por 24 h.

- b) Coloca el tubo de PVC con suelo (o la bolsa de malla con material vegetal) dentro de un frasco de vidrio de 1 L. Evita respirar dentro del frasco, debido a que esto crearía una atmósfera rica en CO₂ en él.
- c) En el vial de cristal, introduce rápidamente 10 ml de NaOH 1 M y tápalo para evitar que el NaOH se contamine con el CO₂ del ambiente.
- d) Destapa el vial con NaOH y con unas pinzas largas introdúcelo rápida y cuidadosamente al interior del frasco que contiene la muestra de suelo. Una vez realizado esto cierra el frasco herméticamente.
- e) Incuba las muestras a 25 °C (o temperatura ambiente) por el tiempo que sea necesario. El tiempo dependerá de la actividad microbiana, la cantidad de suelo o material vegetal, así como de la cantidad y concentración del NaOH. Si la incubación dura más de tres días es conveniente cambiar el vial de NaOH al tercer día para que no se sature éste y dejes airear el interior del frasco por 10 minutos.
- f) Incuba un vial con NaOH en un frasco vacío, sin muestra de suelo, como blanco o testigo. Este blanco permitirá evaluar la contaminación del NaOH con CO₂ del ambiente debido a la manipulación de la muestra durante el proceso de incubación.

2.4.2. Levantamiento de incubación

- a) Retira los frascos de la incubadora para cuantificar el CO₂ respirado. Abre el frasco, extrae el vial con NaOH y tapa de manera inmediata para evitar que el NaOH se contamine con CO₂ del ambiente. Cuando la incubación se deja por más de 3 días, los viales con NaOH se deben de pesar antes y después de la incubación para verificar que no haya un cambio en volumen por evaporación de la solución.
- b) La liberación de CO₂ por los microorganismos se determina por medio de evaluar la cantidad de NaOH que reaccionó con el CO₂ producto de la respiración. Esto se realizará a través de la titulación del NaOH con HCl.

2.4.3. Titulación del NaOH

- a) Coloca 5 ml de BaCl₂ 1.5 N en un matraz de Erlenmeyer de 125 ml, y adiciona el NaOH del vial incubado. La muestra puede adquirir un color blanco lechoso debido a que el BaCl₂ reacciona con el carbonato de sodio (Na₂CO₃) que se formó por la reacción entre el NaOH y el CO₂ durante la incubación, para formar un precipitado de BaCO₃.

- b) Adiciona al precipitado 2-3 gotas de fenolftaleína como indicador, tornándose en un color rosa.
- c) Procede a la titulación con HCl 1 M para determinar la cantidad de NaOH que no reaccionó con el CO₂. Para ello, con la bureta adiciona gota a gota el HCl a la solución hasta que ésta vire de color rosa a blanco. Registra los volúmenes de HCl gastado durante la titulación. Estos procedimientos deben realizarse de manera rápida y evitando que el NaOH remanente se contamine con CO₂ del ambiente.

III. Cálculos

Los cálculos para estimar la tasa de respiración son un poco laboriosos, por lo que se presentan de manera condensada, omitiendo algunos detalles, en la siguiente ecuación (16.4):

$$R = (HCl_{bco} - HCl_m) * M_{NaOH} / 1000 / 2 * 105 * 0.1132 * 1000 / P_m / T$$

Donde:

R = respiración de C (mg C/ g suelo seco / día).

HCl_{bco} = volumen (ml) de HCl gastado para el blanco.

HCl_m = volumen (ml) de HCl gastado para valorar el NaOH incubado con el suelo.

M_{NaOH} = molaridad del NaOH.

1000 = se divide entre 1000 para determinar los moles NaOH que reaccionaron con el CO₂ de la respiración del suelo, lo cual se debe a que la molaridad siempre se expresa en litros, y para transformar a ml hay que dividir entre 1000.

2 = se divide entre 2 debido a la relación 2:1 entre el NaOH y el CO₂ para formar una unidad de carbonato de sodio.

105 = peso molecular del carbonato de sodio (g/mol). Con la aritmética realizada hasta aquí se determinan los gramos de carbonato de sodio producidos en la incubación.

0.1132 = fracción que representa el C en el peso total de una molécula de carbonato de sodio (sin unidades).

P_m = peso seco del suelo incubado (g).

T = tiempo de duración de la incubación (días).

Nota 1: La diferencia entre HCl_{bco} menos HCl_m permite calcular la cantidad de NaOH que reaccionó con el CO₂ respirado, lo cual se basa en la equivalencia 1:1 en la neutralización del NaOH (1 M) y el HCl (1 M).

Nota 2: En caso de querer reportar la respiración como CO₂ en vez de C, hay que transformar el C a CO₂, multiplicando la cantidad de C por 3.67. Esta multiplicación se debe a las diferencias de masa molecular entre ambas formas de C. El peso molecular (PM) del C es 12; el PM del O es 16, por lo que el PM del CO₂ es 44 ((16*2) + (12*1)); por lo tanto, 1 mg C = 44/12 = 3.67 mg CO₂.

Nota 3: La tasa de respiración se determina por unidad de peso seco por lo que hay que corregir la masa del suelo usada en la incubación por su humedad inicial.

IV. Interpretación

La respiración del suelo medida en laboratorio se considera como una tasa potencial de mineralización de carbono o de descomposición de la materia orgánica, debido a que las condiciones de humedad y temperatura son manipuladas para favorecer la actividad de los microorganismos (Hopkins, 2008). En este sentido, es importante mencionar que los valores de respiración obtenidos en condiciones de laboratorio no son similares a los que se pueden obtener en campo y, por lo tanto, no deben ser extrapolados a las condiciones de campo; lo que se puede extrapolar a condiciones de campo son los patrones; es decir, por ejemplo, la probabilidad de que haya mayor respiración en un sitio que en otro o que la respiración aumente o disminuya con relación a cierta condición.

En incubaciones de suelo, donde no hay raíces activas, la respiración normalmente es usada como un indicador de la actividad de los organismos heterótrofos y de la tasa de descomposición de la materia orgánica del suelo en un momento dado (Pell et al., 2005; Askari y Holden 2014), y a menudo se correlaciona positivamente con la concentración de formas de carbono orgánico disponibles o lábiles (Montaño et al., 2007). Dada la alta sensibilidad de la respiración a cambios en la disponibilidad de carbono orgánico lábil y a cambios en la comunidad de microorganismos producidos por disturbios, se le ha considerado como un indicador práctico para detectar la degradación temprana de los suelos (Askari y Holden 2014). De acuerdo con Pell et al. (2005), una pequeña disminución en la respiración del suelo por efecto de un disturbio puede considerarse como relevante debido a la gran diversidad de organismos que respiran en el suelo.

Cuando la respiración del suelo es medida durante un tiempo suficientemente prolongado, puede ser usada como un indicador de la disponibilidad de la fracción de carbono orgánico lábil o mineralizable, la cual es la que los microorganismos heterótrofos degradan con mayor facilidad, y se encuentra en mayor proporción en los residuos relativamente frescos y se va reduciendo conforme la descomposición avanza (véase Hopkins, 2008).

V. Autoevaluación

1. ¿Qué es la respiración y qué diferencia hay entre la respiración autótrofa y la heterótrofa?
2. ¿Cómo se define a la respiración de suelo?
3. ¿Qué factores pueden afectar la respiración del suelo?
4. ¿Para qué puede servir medir la respiración del suelo mediante incubaciones en laboratorio?
5. ¿Por qué la medición de la respiración en laboratorio representa una tasa potencial?

6. Calcula la respiración de suelo con los datos que se presentan en la tabla de abajo. Para cada caso supón que se usaron 100 g de suelo fresco con una humedad del 9%, se usaron 10 ml de NaOH 1 M para determinar la respiración, para valorar el blanco se gastaron 9.7 ml de HCl 1 M. La incubación del suelo duró 3 días.

| Gasto de HCl de las muestras (ml) | Respiración (mg C/g suelo seco/día) | Respiración (mg CO ₂ /g suelo seco/día) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| 5.3 | | |
| 3.4 | | |
| 2.1 | | |

Actividad enzimática en el suelo

17

Yunuen Tapia Torres

En este capítulo se espera que el estudiante reconozca el papel de las enzimas en el suelo y aprenda los métodos para extraerlas y cuantificarlas a partir de muestras ambientales.

I. Introducción

Los residuos orgánicos derivados de las plantas son la fuente principal de energía y nutrientes para los microorganismos heterótrofos del suelo y proveen el material principal para la formación de la materia orgánica del suelo (MOS). La cantidad de los residuos, su composición y sus propiedades biogeoquímicas son factores esenciales que controlan la formación de la materia orgánica del suelo y, por tanto, los procesos de **humificación** en los ecosistemas terrestres (Swift et al., 1979).

La descomposición de la materia orgánica es el término que se emplea de forma general para referirse a la transformación de materiales orgánicos de origen vegetal, microbiano y animal a formas más sencillas, inclusive inorgánicas (Berg, 2000). La descomposición engloba a su vez dos subprocesos que se llevan a cabo de manera simultánea: la **despolimerización** y la mineralización (Chapin III et al., 2014). La primera es la fragmentación de partículas orgánicas grandes en otras cada vez menores, hasta que los componentes estructurales ya no son reconocibles (Chapin III et al., 2014). De forma general, se asume que las moléculas orgánicas complejas de gran tamaño (celulosa, hemicelulosa, lignina) son degradadas o despolimerizadas principalmente por procesos hidrolíticos y oxidativos bióticos en compuestos de bajo peso molecular mediante una reacción enzimática. Por su parte, la mineralización es una oxidación de estos compuestos orgánicos hasta obtener los compuestos inorgánicos simples que los constituyen (CO_2 , H_2S , NH_4^+ , PO_4^- , H_2O), los cuales representan las formas disponibles para las plantas (Schlesinger, 2000). A la vez, durante este proceso de mineralización parte de los materiales orgánicos son incorporados en la biomasa de los microorganismos heterótrofos (Maltby, 1999). Estos dos procesos son de gran importancia para la productividad de las plantas, sobre todo cuando la cantidad de los nutrientes esenciales que entran a los ecosistemas cada año es limitada (Gartner y Cardon, 2004). Sin embargo, la mineralización de los nutrientes de las moléculas complejas no es posible si primero no se ha realizado la despolimerización (Chapin III et al., 2014).

Las enzimas necesarias para que se realicen los procesos de despolimerización y mineralización en el suelo son principalmente de origen microbiano (bacterias y hongos) y actúan de manera extracelular (Chapin III et al., 2014). Existe una gran diversidad de enzimas extracelulares presentes en el suelo que están involucradas en la despolimerización de la materia orgánica y que permiten la disponibilidad de los nutrientes para las plantas y los microorganismos en los ecosistemas. Dentro de esta gran diversidad de enzimas, existen algunas que se han utilizado como indicadores de la capacidad de los microorganismos para degradar moléculas ricas en C (celulasas, lactasas, polifenol oxidasas, xylanasas, pectinasas), N (proteasas, aminopeptidasas, ureasas), P (fosfatasas) y S (arilsulfatasas) por lo que se utilizan como un indicador del ciclaje de estos elementos en los ecosistemas (Tabatabai y Bremer 1969; Verchot y Borelli, 2005; Tapia-Torres et al., 2015). En el presente protocolo se presenta una metodología para medir la actividad de algunas enzimas presentes en el suelo basada en métodos espectrofotométricos.

En las reacciones enzimáticas de despolimerización se forman complejos enzima-sustrato, en los que un sustrato entra al sitio activo de una enzima, y a través de ello promueve una reacción química que rompe al sustrato en subproductos. También hay reacciones enzimáticas de síntesis, en las que a través de los complejos enzima-sustrato se genera un subproducto a través de la unión de dos sustratos.

II. Método

2.1. Principio

La presente metodología para cuantificar la actividad de una enzima de una muestra ambiental utiliza sustratos unidos a paranitrofenol (p-NP), el cual tiene la propiedad de absorber radiación en la región visible y en la región ultravioleta del espectro. En condiciones controladas de temperatura, pH y tiempo (Burns y Dick, 2002), los sustratos reaccionan con la enzima producida por los microorganismos, liberando el p-NP al mismo tiempo que generan una coloración. La intensidad de esta coloración se determina por espectrofotometría y permite calcular la concentración de la enzima liberada en distintas muestras ambientales.

2.2. Material y equipos

| Materiales | |
|-------------|-----------------------------------|
| Campo | Bolsas de plástico |
| Campo | Espátula |
| Campo | Plumón marcador |
| Campo | Etiquetas |
| Campo | Pala |
| Laboratorio | Tubos de centrifuga de 50 ml |
| Laboratorio | Tubos de centrifuga de 25 ml |
| Laboratorio | Tubo de microcentrifuga de 1.5 ml |

| Laboratorio | Vaso de precipitados de 150 ml |
|-------------|--------------------------------|
| Laboratorio | Matraz volumétrico 500 ml |
| Laboratorio | Probeta de 100 ml |
| Laboratorio | Piseta |
| Equipos | |
| Laboratorio | Micropipetas |
| Laboratorio | Incubadora |
| Laboratorio | Centrífuga |
| Laboratorio | Vortex |
| Laboratorio | Balanza |
| Laboratorio | Espectrofotómetro |
| Laboratorio | Medidor de pH |

2.3. Reactivos

| Reactivo | Preparación |
|---|---|
| Agua destilada | N. A. |
| Hidróxido de sodio (NaOH) 1N | Disolver 10 g de NaOH en 250 ml de agua destilada. |
| Ácido acético 0.2 M | Mezclar 1.115 ml de ácido acético en 100 ml de agua destilada. |
| Acetato de sodio tri-hidratado 0.2 M | Disolver 6.8 g de acetato de sodio en 250 ml de agua destilada. |
| Buffer de acetatos pH 5 | Mezclar 35.2 ml de acetato de sodio 0.2 M con 14.8 ml de ácido acético 0.2M, revisar el pH 5 y aforar a 100 ml con agua destilada. |
| Buffer de acetatos pH 5.5. | Mezclar 39.5 ml de acetato de sodio 0.2 M con 10.5 ml de Ácido acético 0.2 M, revisar el pH y aforar a 100 ml con agua destilada. |
| Fosfomonoesterasa (pNP- fosfato) 10mM | Disolver 92.5 mg de pNP- fosfato en 25 ml del buffer de acetatos pH 5. Este sustrato puede variar dependiendo de la enzima que se desee cuantificar (ver Anexo 1) |
| TRIS (Base)) (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃) | N. A. |
| Ácido maléico | N. A. |
| Ácido cítrico | N. A. |
| Ácido bórico | N. A. |

| | |
|---------------------------|--|
| Buffer universal (MUB) 1X | Mezclar 6.05 g de TRIS (Base), 5.8 g de ácido maléico, 7.0 g de ácido cítrico y 3.15 g de ácido bórico en 244 ml de agua desionizada, y aforar a 500 ml con agua desionizada. Esta solución de MUB está a 5x y queda con un pH final de aproximadamente 2. La solución de trabajo requiere el MUB 1X a pH de la muestra, para ello primero hay que ajustar el pH requerido. Por ejemplo, para un MUB pH 5, mezclar 20 ml de MUB 5X con aproximadamente 2.8 ml de NaOH 1M, y aforar a 100 ml con agua desionizada. Para un MUB pH 9, mezclar 20 ml de MUB 5X con aproximadamente 6 ml de NaOH 1M, y aforar a 100 ml con agua desionizada. |
|---------------------------|--|

N. A. = no aplica.

2.4. Procedimiento

2.4.1. Obtención de la muestra ambiental

Colecta una muestra ambiental de tu interés (suelo, sedimento, agua). Para ello, usa material limpio y de ser posible estéril. Para muestras de suelo o sedimento, colecta aproximadamente 10 g de material en una bolsa de plástico y mantenla en refrigeración a 10 °C. Para muestras de agua, colecta 10 ml de la muestra en frasco de plástico estéril y mantenla en refrigeración.

2.4.2. Determinación de pH de la muestra ambiental

El valor de pH de la muestra es necesario para ajustar el pH del buffer MUB que se utilizará en las extracciones de las enzimas. Para esta determinación seguir el procedimiento que se describe en la sección 7 de pH del presente manual.

2.4.3. Extracción de la enzima a partir de la muestra ambiental

Antes de iniciar, es importante y necesario para cada ensayo hacer un control del sustrato de la enzima que se va a cuantificar y un control para cada una de las muestras que se tenga. La preparación inicial de los controles es diferente, posteriormente deben de recibir el mismo tratamiento de incubación y dilución al igual que todas las muestras. Es recomendable tener por lo menos 3 réplicas por muestra.

- a) Pesa 2 g de suelo fresco o 2 ml de la muestra acuosa y colócalos en tubos de centrifuga de 45 ml.

- b) Adiciona 30 ml de buffer MUB ajustado al pH de la muestra (el pH del buffer se debe ajustar dependiendo del pH de la muestra a analizar).
- c) Agita durante 15 min en posición horizontal, y posteriormente deja reposar las muestras durante 10 min en posición vertical.

Nota: A partir de este punto, es importante hacer las tres réplicas de cada muestra.

- d) Toma 670 μ l del homogeneizado y ponlo en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
- e) Agrega 670 μ l del sustrato de fosfomonoesterasa (pNP- fosfato) (o de alguna otra enzima a la cual se le quiera determinar la actividad) (Tabla 17.1.).
- f) Agita con ayuda del vortex (5 s).
- g) Incuba con agitación, a la temperatura (t°) y tiempo específicos para cada enzima (Tabla 17.1).

2.4.4. Control de la muestra (CM)

- a) Toma 670 μ l del homogeneizado y colócalos en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
- b) Agrega 670 μ l de MUB con pH de la muestra.
- c) Agita con ayuda del vortex (5 s).
- d) Incuba con agitación.

2.4.5. Control del sustrato (CS)

Nota: es importante hacer 3 réplicas del control del sustrato.

- a) Toma 670 μ l del sustrato de fosfomonoesterasa (pNP- fosfato) y colócalos en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
- b) Agrega 670 μ l de MUB con pH de la muestra.
- c) Una vez terminado el tiempo de incubación, centrifuga las muestras a 10,000 rpm durante 2 min.
- d) Saca las muestras con mucho cuidado para evitar contaminar el sobrenadante. En este punto, lo importante es extraer el sobrenadante que es donde se encuentra la reacción de enzima extraída de la muestra con el sustrato que se preparó.

2.4.6. Preparación de la muestra de lectura para sustratos unidos a paranitrofenol (p-NP)

- e) Toma 750 μ l del sobrenadante y colócalos en tubos de centrífuga de 15 ml.
- f) Adiciona 75 μ l de NaOH 1 N (para parar la reacción).
- g) Agrega 2 ml de agua.
- h) Agita.

2.4.7. Lecturas utilizando el espectrofotómetro

- Se recomienda que prendas el espectrofotómetro 5 min antes de usarlo y calíbralo a una λ de 410 nm.
- La lectura se debe de ajustar a cero usando agua destilada.
- Toma 1 ml de muestra y colócala en la celda perfectamente lavada.
- Coloca la celda dentro del espectro.
- Lee la absorbancia.
- Saca la celda, desecha la muestra y lava con agua destilada, cuidando que la celda quede lo más seca posible antes de realizar la siguiente lectura.
- Realiza la lectura de la siguiente muestra y así hasta concluir con el total de las muestras.
- La curva de calibración para todos los sustratos unidos a pNP (para-nitrofenol) se hace utilizando pNP puro.

Tabla 17.1. Enzimas involucradas en diferentes procesos de adquisición de energía y nutrientes (P y S) y los sustratos a utilizar para determinar su actividad. También se presentan las temperaturas de almacenamiento de los diferentes sustratos, la concentración a la cual se deben de utilizar, y el tiempo y temperatura de incubación en cada ensayo

| Proceso | Enzima | Sustrato | t° de almacen | Concen-tración | Preparación | t° y tiempo de incubación |
|------------------------------|---|--------------------------------------|---------------|----------------|--|---------------------------|
| Degradación de celulosa | Celobiohidrolasa (CBH) | pNP-celobiosido | 2-8 °C | 4 mM | 0 . 0 4 6 3 5 g/25 ml buffer acetatos pH 5 | 40 °C 4 h |
| | β -glucosidasa | pNP-glucopiranosido | -20 °C | 10 mM | 0 . 0 7 5 3 5 g/25 ml buffer acetatos pH 5 | 40 °C 2 h |
| Degradación de polisacaridos | β -n-acetyl-glucosaminidasa (NAG) | pNP- β -n-acetyl-glucosaminido | -20 °C | 4 mM | 0 . 0 3 4 2 5 g/25 ml buffer acetatos pH 5 | 40 °C 3 h |
| Transformación de lignina | Polifenol oxidasa (lacassa) | ABTS | 4 °C | 10 mM | 0 . 0 6 2 8 5 g/25 ml buffer acetatos pH 5 | 40 °C 2 h 30 |
| Adquisición de P | Fosfomonoesterasa fosfatasa | pNP-fosfato | -20 °C | 10 mM | 0.0928 g/25 ml buffer acetatos pH 5 | 40 °C 1 h 15 |
| | Fosfodiesterasa | BIS-pNP- fosfato | -20 °C | 10 mM | | 40 °C 1 h 15 |
| | Fosfonatasa | 2- aminoetil fosfonato | TA | 10 mM | | 40 °C 1 h 15 |
| | 2AEP-piruvatominotransferasa | 2- aminoetil fosfonato | TA | 10 mM | | 40 °C 2 h |
| Adquisición de S | Aril sulfatasas | pNP- Sulfato | -20 | 10 mM | | 40°C 2 h |

III. Cálculos

La actividad enzimática se calcula en unidades de $\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$, de acuerdo con la siguiente ecuación (17.1):

$$\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1} = \frac{\text{Absorbancia neta}}{\text{coef. ext. } (\mu\text{mol ml}) * \text{vol. ens. (ml)} * \text{tiempo (h)} * \frac{\text{PS}}{\text{vol. ext. } \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)} * \text{vol. hom. (ml)}}$$

Donde:

Absorbancia neta = absorbancia muestra - (absorbancia CM + absorbancia CS).

coef.ext. = pendiente (m) de la curva de concentración de 4-nitrofenol ($y=mx+b$) ($\mu\text{mol ml}$)

vol.ens. = alícuota de extracción + sustrato (0.670 ml + 0.670 ml = 1.34 ml)

Tiempo= tiempo de incubación (dependiendo de la enzima) (h)

PS = peso seco de suelo (g) (PF*(PS / PH))

vol.ext. = cantidad de MUB empleada para la extracción de la enzima (30 ml)

vol.hom. = volumen de alícuota utilizada post-incubación (0.750 ml)

IV. Interpretación

La actividad enzimática es usada como indicadores de la capacidad de los microorganismos para degradar moléculas ricas en C (celulasas, laccasas, polifenol oxidasas, xylanases, pectinasas), N (proteasas, aminopeptidasas, ureasas), P (fosfatasas) y S (arilsulfatasas) y como un indicador del ciclaje de estos elementos en los ecosistemas (Tabatabai y Bremer 1969; Verchot y Borelli, 2005; Tapia-Torres et al., 2015). En este contexto, las enzimas que se eligen para realizar un ensayo dependen de la pregunta que se quiere responder (German et al., 2011). Por ejemplo, si uno está interesado en estudiar los ciclos del C y N, es probable que se analicen las enzimas hidrolíticas involucradas en la degradación de carbohidratos y proteínas, o si se está interesado en el ciclo del fósforo, el enfoque de los ensayos puede dirigirse a las enzimas que producen fosfatos a partir de los sustratos disponibles (Tabla 17.2) (German et al., 2011; Tapia-Torres et al., 2015). Cabe mencionar, que la actividad enzimática determinada con este método es una actividad potencial, ya que en los ensayos se usan concentraciones de sustrato altas que permiten una actividad enzimática máxima.

Tabla 17.2. Funciones de algunas enzimas cuya actividad suele ser medida en suelos

| Enzima | Función |
|----------------------------|---|
| β -glucosidasa | Enzima involucrada en el ciclo del carbono. Transforma compuestos de cadenas cortas de celulosa a glucosa, la cual puede ser usada como fuente de energía para los microorganismos. |
| Celobiohidrolasa | Degrada la celulosa y libera celobiosa. Importante en el ciclo del carbono. |
| Polifenol oxidasa (Lacasa) | Oxida compuestos fenólicos, por lo que está involucrada en la degradación de la lignina y en el proceso de humificación. Su actividad se relaciona con la degradación de compuestos recalcitrantes y estados avanzados de la descomposición de un residuo vegetal. La actividad de esta enzima puede ser suprimida por altas concentraciones de N, debido a fertilización o depósito atmosférico. |
| Fosfatasa | Transforma compuestos orgánicos fosfatados a formas disponibles inorgánicas (fosfato). Su concentración puede estar relacionada positivamente con la concentración de fósforo orgánico, pero también se han encontrado relaciones negativas con la concentración de fosfato. La secreción de fosfatasa es regulada como una respuesta a condiciones exógenas como deficiencia de fosfato. Las fosfatasas se clasifican según el tipo de sustrato sobre el que actúan. Por ejemplo, las fosfomonoesterasas catalizan la hidrólisis de fosfomonoésteres orgánicos, mientras que las fosfodiesterasas catalizan la hidrólisis de fosfodiésteres orgánicos. Sin embargo, es probable que las fosfatasas tengan una amplia especificidad de sustrato, de modo que las fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas compartan sustratos comunes. |
| Arilsulfatasa | Libera fuentes disponibles de sulfato de fuentes orgánicas. |

Fuentes: Alkorta et al., 2003; Shaw y Burns, 2006; German et al., 2011; Burns et al., 2013

De acuerdo con Burns y Dick (2002) la interpretación de un ensayo enzimático suele ser complicada, en particular cuando se quieren comprender los mecanismos subyacentes a un cambio determinado en la actividad de una enzima particular por un disturbio. Estos mecanismos pueden estar relacionados con algunas dualidades, tales como crecimiento o muerte microbiana, represión o inducción, inhibición o activación enzimática; por ejemplo, el incremento en la actividad de una enzima particular del suelo en respuesta a un disturbio puede interpretarse en términos de cinco procesos diferentes no mutuamente excluyentes: a) inducción enzimática, b) activación enzimática, c) un cambio en la comunidad hacia una especie que produce mayores cantidades de la enzima, d) crecimiento microbiano, y e) lisis celular

y liberación de enzimas intracelulares (Burns y Dick 2002). Por esta dificultad y para una mejor interpretación, se recomienda que en este tipo de ensayos se analicen tantas enzimas como sea posible para tener una imagen más completa de la actividad microbiana de la muestra; además de realizar mediciones concurrentes de otros parámetros como biomasa microbiana, diversidad microbiana, concentración de carbono, concentración de algunos compuestos o nutrientes de interés, respiración del suelo, pH, humedad, entre otros (Alkorta et al., 2003; Burns y Dick, 2002; Nannipieri et al., 2012; Burns et al., 2013).

V. Autoevaluación

1. ¿Qué es la despolimerización?
2. ¿Qué es la mineralización?
3. ¿Qué es una enzima extracelular y que función tiene?
4. Menciona de uno a tres ejemplos de enzimas que actúan sobre compuestos ricos en carbono, nitrógeno, fósforo y azufre.
5. ¿Por qué se usan sustratos unidos a paranitrofenol para medir la actividad enzimática (qué propiedad tiene el paranitrofenol)?
6. Si quisieras estudiar la actividad enzimática relacionada con la degradación de compuestos humificados y la mineralización de N, ¿qué enzimas extracelulares estudiarías?

Anexos

Anexo 1

- Preparación de soluciones para método de actividad enzimática

NaOH 1 N Para 250 ml agua desionizada

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| NaOH | 10 g |
| Agua desionizada | 250 ml |

Modified Universal Buffer (MUB) para aforar en 500 ml de agua desionizada

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| TRIS (Base) | 6.05 g |
| Ácido maléico | 5.8 g |
| Ácido cítrico | 7.0 g |
| Ácido bórico | 3.15 g |
| Agua desionizada | 244 ml |

Nota: La solución de MUB esta 5x y queda con un pH final de aproximadamente 2.
La solución de trabajo requiere el MUB 1X a pH de la muestra.

Ejemplos de ajuste de pH para 100 ml de agua desionizada
MUB pH=5

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------|---------------|
| MUB (5 x) | 20 ml |
| Ajustar pH con NaOH (1 M) | Aprox. 2.8 ml |

MUB pH= 9 para 100 ml de agua desionizada

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------|---------------|
| MUB (5 x) | 20 ml |
| Ajustar pH con NaOH (1 M) | Aprox. 6.0 ml |

Buffer de acetatos

Solución stock para 100 ml de agua desionizada

(A) Ácido acético 0.2 M

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| Ácido acético | 1.155 ml |
| Agua desionizada | 100 ml |

(B) Acetato de sodio tri-hidratado 0.2 M para 250 ml de agua destilada

| Reactivo | Cantidad |
|------------------|----------|
| Acetato de sodio | 6.8 g |
| Agua desionizada | 250 ml |

- Preparación de solución final del buffer de acetatos a pH=5

Buffer de acetatos a pH=5 para 100 ml y 500 ml, respectivamente

| Solución A | Solución B | pH |
|------------|------------|-----|
| 14.8 ml | 35.2 ml | 5.0 |
| 10.5 ml | 39.5 ml | 5.5 |

| Solución A | Solución B | pH |
|------------|------------|-----|
| 74 ml | 176 ml | 5.0 |

Nota: el volumen final es de 250 ml y aforar a 500 ml.

Poner los 176 ml de acetato de sodio y 60 ml de ácido acético. Los 14 ml que restan de ácido agregarlos poco a poco midiendo el pH en el potenciómetro.

- Preparación de sustratos

Fosfomonoesterasa 10 mM para 25 ml de buffer de acetatos a pH=5

| Reactivo | Cantidad |
|--------------|----------|
| pNP- fosfato | 92.8 mg |
| Buffer | 25 ml |

Tabla de Unidades

| Abreviatura | Significado |
|-------------------------------------|---------------------|
| Unidades de tiempo | |
| h | hora |
| min | minuto |
| s | segundo |
| Unidades de distancia y área | |
| km | kilómetro |
| m | metro |
| cm | centímetro |
| mm | milímetro |
| μm | micrómetro |
| nm | nanómetro |
| ha | hectárea |
| m^2 | metro cuadrado |
| cm^2 | centímetro cuadrado |
| Unidades de volumen | |
| L | litro |
| ml | mililitro |
| μl | microlitro |
| m^3 | metros cúbico |
| cm^3 | centímetro cúbico |
| % | porcentaje |

| | |
|--|-----------------------|
| Unidades de masa | |
| Pg | petagramo |
| Gg | gigagramo |
| Mg | megagramo |
| kg | kilogramo |
| g | gramo |
| mg | miligramo |
| μg | microgramo |
| Unidades de calor y temperatura | |
| $^{\circ}\text{C}$ | grado centígrado |
| cal | caloría |
| Unidades de concentración | |
| M | molaridad o molar |
| N | normalidad o normal |
| % | porcentaje |
| p/v | relación peso volumen |
| Unidades de conductividad | |
| S | Siemens |
| dS | decisiemens |
| mS | milisiemens |

Glosario

- Absorbancia.** Medida de la cantidad de luz absorbida por una solución, normalmente se mide con un colorímetro o espectrómetro.
- Adsorción.** Atracción de iones o compuestos a la superficie de un sólido. Los coloides del suelo adsorben una gran cantidad de iones y agua.
- Agentes cementantes.** Sustancias orgánicas o inorgánicas que unen partículas del suelo entre sí, tales como materia orgánica, carbonato de calcio, u óxidos de silicio, hierro y aluminio.
- Agregación [del suelo].** Proceso por medio del cual se unen las partículas del suelo para formar agregados.
- Agregado [del suelo].** Grupo de partículas minerales del suelo unidas entre sí en una sola masa o clúster por la mediación de polisacáridos, hifas o minerales del suelo.
- Agua disponible.** Proporción de agua en un suelo que puede ser fácilmente absorbida por las raíces de las plantas. Generalmente se considera como el agua retenida en el suelo a una presión de hasta aproximadamente 15 bares. Se calcula como la diferencia entre el agua a capacidad de campo menos el agua en punto de marchitez permanente.
- Agua gravitacional.** Agua que se infiltra y percola dentro del suelo por efecto de la gravedad.
- Agua higroscópica.** Cantidad de humedad en un suelo seco cuando está en equilibrio con cierta humedad relativa estándar cerca de una atmósfera saturada (aproximadamente 98%). Se expresa en términos de porcentaje sobre la base de suelo seco al horno.
- Albedo.** Fracción de la radiación de onda corta incidente reflejada desde una superficie.
- Alófono.** Mineral del tipo de los aluminosilicatos amorfos, cuya estructura consiste en cristales tridimensionales cortos intercalados con materiales no cristalinos amorfos. Normalmente prevalece en materiales derivados de cenizas volcánicas.
- Anaeróbico.** Que ocurre en ausencia de oxígeno.
- Arcilla.** Partículas del suelo con un tamaño menor a 0.002 mm ($2 \mu\text{m}$).
- Bases intercambiables.** Es la suma de los cationes intercambiables, con la excepción de los cationes ácidos (H^+ y Al^{3+}).
- Biomasa.** Cantidad de material vivo (p.ej. biomasa vegetal).
- Calidad del suelo.** La capacidad de un suelo específico para funcionar, dentro de las fronteras de un ecosistema natural o manejado, para mantener la productividad de plantas y animales, mantener o enaltecer la calidad del agua y aire, y soportar la salud y asentamiento humano. Generalmente considerado en relación a su capacidad sin disturbio, en un estado natural. Habilidad de un suelo para desarrollar una función específica.
- Capacidad de campo (humedad a capacidad de campo).** Porcentaje de agua que permanece en un suelo después de que éste ha sido saturado y que el drenaje libre del agua ha cesado (el agua gravitacional ha drenado).
- Capacidad de intercambio catiónico.** Suma total de cationes intercambiables que un suelo puede absorber. Se expresa en centimoles de cargas positivas por kilogramo de suelo (cmol (+)/kg).
- Cationes ácidos.** Cationes (iones con carga positiva), principalmente Al^{3+} y Fe^{3+} y H^+ , que contribuyen a la actividad de iones H^+ , tanto de manera directa o a través de reacciones de hidrólisis con el agua.
- Cationes intercambiables.** Cationes que se encuentran adheridos a las superficies negativas de los coloides del suelo por atracción electrostática. Estos cationes se intercambian continuamente con aquellos que están en la solución del suelo.

- Cationes polivalentes.** Iones con carga positiva que pueden tener diferentes magnitudes de carga. Por ejemplo, el hierro puede tener dos o tres cargas positivas, entre otras, las cuales se denotan como Fe^{2+} y Fe^{3+} .
- Cepa.** Población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o provenientes de una muestra en particular, la que usualmente es propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.
- Coloide (suelo).** Material orgánico o inorgánico con un tamaño de partícula muy pequeño y una correspondiente alta área superficial por unidad de masa.
- Conductividad eléctrica.** Capacidad de una sustancia para conducir o transmitir una corriente eléctrica. En agua o suelos se mide en Siemens / metro, y se relaciona con los solutos disueltos.
- Conductividad hidráulica.** Una expresión de la velocidad con la que un líquido, como el agua, fluye a través de un sólido, como el suelo, en respuesta a un dado gradiente de potencial.
- Depósito atmosférico.** Entra atmosférica de materiales a un ecosistema.
- Descomposición.** Rompimiento de la materia orgánica muerta a través de la fragmentación, la alteración química y el lavado.
- Desnitrificación.** Transformación de nitrato a formas gaseosas de nitrógeno (N_2 , NO y N_2O).
- Desorción.** Remoción de los materiales adsorbidos en la superficie de un sólido.
- Despolimerización.** Proceso de descomposición de polímeros en unidades más pequeñas, hasta monómeros.
- Detrito.** Material vegetal y animal muerto, incluidas hojas, tallos, raíces, animales muertos y heces de animales.
- Disociación.** Proceso por el cual las moléculas se separan en moléculas más pequeñas o iones, usualmente de manera reversible.
- Ecosistema.** Sistema ecológico que consiste en todos los organismos en un área y el entorno físico con el que interactúan.
- Enzima.** Molécula orgánica producida por un organismo que cataliza una reacción química.
- Enzima extracelular.** Enzima que es secretada por un organismo al ambiente.
- Erodabilidad.** Susceptibilidad de un suelo a sufrir erosión.
- Erosión.** (1) El desgaste de la superficie terrestre debido a escorrentía, viento, hielo u otros agentes geológicos, incluyendo el proceso de arrastre o deslizamiento por la fuerza de la gravedad. (2) Desprendimiento y movimiento del suelo y las rocas por el agua, el viento, el hielo o la gravedad.
- Esterilizar.** Dejar una sustancia o material libre de organismos.
- Estructura del suelo.** La combinación o arreglo de las partículas primarias del suelo en unidades secundarias, agregados o peds. Las unidades secundarias pueden estar, pero normalmente no lo están, dispuestas en el perfil de tal manera que dan un patrón característico.
- Evapotranspiración.** Pérdida de agua de un ecosistema por transpiración y evaporación superficial; equivalente al flujo de calor latente, pero expresado en unidades de agua.
- Extracto de saturación.** Solución del suelo obtenida cuando el suelo se encuentra en un punto de saturación con agua.
- Extracto de suelo.** La solución del suelo separada del mismo por filtración, centrifugación, succión o presión.
- Fracción de arcilla.** Fracción de los minerales del suelo con un diámetro menor a $2 \mu\text{m}$.
- Fracción fina del suelo.** Fracción del suelo con un diámetro menor a 2 mm.
- Gas de efecto invernadero.** Gas atmosférico que absorbe radiación de onda larga.
- Hojarasca.** Caída de partes aéreas de las plantas y de plantas muertas.
- Heterótrofos.** Organismo que consume materia orgánica producida por otros organismos como fuente de energía y carbono en lugar de producir materia orgánica a partir de CO_2 y energía del ambiente. Los heterótrofos incluyen descomponedores, consumidores y parásitos.

- Hidrólisis.** Una reacción con agua que rompe la molécula de agua en los iones H^+ y OH^- . Las moléculas o átomos que participan en esta reacción se dice que hidrolizan.
- Horizonte del suelo.** Una capa del suelo, aproximadamente paralela a la superficie del suelo, que difiere en propiedades y características de las capas adyacentes arriba o debajo de ella. Horizonte diagnóstico: horizonte del suelo que tiene características que son indicativas de ciertas clases de suelos. Los horizontes que están en la superficie del suelo se les denominan epipedones; mientras que a aquellos que están por debajo de la superficie se les denomina horizontes subsuperficiales.
- Humificación.** Proceso no enzimático por el cual los productos orgánicos recalcitrantes de la descomposición se agrupan para formar humus.
- Humus.** Mezcla compleja de compuestos orgánicos del suelo con estructura altamente irregular.
- Imogolita.** Es un silicato de aluminio tubular, de la clase de los filosilicatos, del grupo de mineral de arcillas.
- Infiltración.** Movimiento de agua al interior del suelo.
- Inmovilización.** Remoción de nutrientes inorgánicos disponibles por absorción microbiana y fijación química en el suelo.
- Inocular.** Introducir microorganismos en una sustancia, normalmente a un medio de cultivo.
- Intemperismo químico.** Cambios químicos producidos en las rocas y minerales del suelo, en o cerca de la superficie del suelo por el agua y otros agentes atmosféricos.
- Labranza.** Manipulación mecánica de los suelos para algún propósito; en la agricultura es normalmente restringida a la modificación de las condiciones del suelo para la producción agrícola.
- Lluvia ácida.** Lluvia con un pH bajo debido a altas concentraciones de ácido sulfúrico y/o ácido nítrico asociadas a la contaminación de la atmósfera por la combustión de combustibles fósiles.
- Lixiviación.** Movimiento descendente de materiales en solución. Ésta puede ocurrir desde el dosel hasta el suelo, desde la materia orgánica del suelo hasta la solución del suelo, de un horizonte del suelo a otro, o desde el ecosistema hasta las aguas subterráneas o los ecosistemas acuáticos.
- Macronutriente.** Un elemento químico que requieren las plantas en grandes cantidades para su crecimiento ("macro" se refiere a la cantidad y no a la esencialidad del elemento). Incluye a C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, y S.
- Materia orgánica [del suelo].** Mezcla de materiales orgánicos en el suelo incluyendo materia orgánica particulada, materia orgánica alterada de forma tal que carece de su organización estructural original, carbón vegetal, biomasa microbiana y raíces finas de plantas.
- Mantillo.** Material muerto de plantas con diferentes grados de descomposición pero que cuya naturaleza puede ser reconocible; normalmente se encuentra sobre la superficie del suelo.
- Medio de cultivo.** Sustancia con nutrientes preparada para el crecimiento de microorganismos en un laboratorio.
- Micorriza.** Relación simbiótica entre las raíces de las plantas y las hifas de hongos, en las que la planta adquiere nutrientes del hongo a cambio de carbohidratos que constituyen una fuente de carbono para el hongo.
- Minerales de arcilla.** Material inorgánico natural (generalmente cristalino) que se encuentra en suelos y en sedimentos, con tamaño de partícula de arcilla, es decir <0.002 mm de diámetro.
- Mineralización.** Conversión de carbono y nutrientes de formas orgánicas a inorgánicas debido a la descomposición del mantillo y la materia orgánica del suelo.
- Morfoespecie (o morfotipo).** Grupo de organismos con características morfológicas comunes, que pueden ser de una misma especie o de diferentes especies.
- Nicho ecológico.** (1) Hipervolumen en el espacio multidimensional de variables ecológicas dentro del cual una especie puede mantener una población viable. (2) Papel ecológico de un organismo en un ecosistema.

Nitrificación. Conversión del amonio a nitrato. Los nitrificadores autótrofos usan la energía liberada de la oxidación del amonio (NH_4^+) para fijar el carbono que requieren para su crecimiento y mantenimiento, de forma análoga a la forma en que las plantas usan la energía solar para fijar el carbono mediante la fotosíntesis. Los nitrificadores heterotróficos obtienen su energía de la descomposición de la materia orgánica.

Oclusión (fósforo ocluido). Fosfato no disponible que está fuertemente unido a óxidos de aluminio o hierro en el suelo.

Oxidación. Químicamente, pérdida de uno o varios electrones por una sustancia donante de electrones en reacciones de oxidación-reducción. En los organismos, el uso de la energía derivada de las reacciones químicas implica reacciones de oxidación-reducción (redox). En bioquímica, la oxidación (y la reducción) implican frecuentemente no solo la transferencia de electrones sino de átomos completos de hidrógeno.

Pedogenético. Relativo a la formación de los suelos.

Pedología. Rama de las ciencias del suelo que estudia la formación de los suelos en su ambiente natural.

Permeabilidad. La facilidad con la que los gases, líquidos o raíces de las plantas penetran a través de la matriz del suelo o a través de una capa de éste.

pH activo. La actividad de los iones hidrógeno en la fase acuosa de un suelo. Es medido y expresado como un valor de pH.

pH tamponado. Actividad de los iones hidrógeno de un suelo determinada con una solución salina como CaCl_2 . El hidrógeno y el aluminio intercambiables pueden ser reemplazados de las superficies de intercambio de un suelo ácido por una solución como el KCl o CaCl_2 .

Potencial hídrico. Energía potencial que tienen las moléculas de agua para realizar trabajo. Medida de la diferencia entre el estado de energía libre del agua en el suelo y el del agua pura, y se mide en unidades de presión. Se usa para predecir el movimiento del agua, de mayor a menor nivel de energía.

Precipitado. Sustancia que se separa de una disolución en forma sólida.

Procesos de óxido-reducción. Reacción química en la que uno o más electrones se transfieren entre reactivos, provocando un cambio en sus estados de oxidación.

Productividad primaria. Conversión de CO_2 , agua y energía solar en biomasa. La productividad primaria bruta (PPB) es la ganancia de carbono en los ecosistemas, es decir, la fotosíntesis neta expresada en la escala del ecosistema (Mg C/ha/año). La productividad primaria neta (PPN) es la acumulación neta de carbono por la vegetación (PPB menos la respiración de las plantas).

Punto de marchitamiento. Contenido de humedad del suelo, sobre una base seca, en el que las plantas se marchitan y no recuperan su turgencia cuando se colocan en una atmósfera oscura y húmeda.

Red trófica. Red de alimentación entre organismos.

Reducción. Ganancia de electrones por un aceptor de electrones en reacciones de oxidación-reducción

Relaciones estequiométricas. Relaciones cuantitativas entre elementos.

Respiración. Proceso bioquímico intracelular en el que un compuesto es oxidado con O_2 (o con un sustituto del O_2), que funciona como aceptor final de electrones, y que normalmente se acompaña de la producción de ATP por fosforilación oxidativa. Proceso bioquímico por el cual se oxidan los carbohidratos con O_2 a CO_2 y agua, liberando energía que es almacenada en moléculas de ATP y que puede ser usada para el crecimiento y el mantenimiento.

Rizósfera. Zona del suelo que es directamente afectada por las raíces de las plantas.

Sales. Compuestos químicos formados por iones con carga positiva (cationes) y con iones con carga negativa (aniones) unidos mediante un enlace iónico.

Silicato. Mineral compuesto de silicio y oxígeno, y en ocasiones por otros elementos. Los suelos sódicos tienen 15% o más Na más Mg intercambiables en el complejo de intercambio dentro de 50 cm de la superficie del suelo.

Simbiosis. Asociación íntima entre dos organismos disímiles en la que por lo menos uno de los interactuantes se beneficia de la interacción.

Solución o disolución. Mezcla homogénea de dos o más sustancias.

Suelo. Cuerpo natural compuesto de sólidos (materia mineral y orgánico) líquidos y gases ubicado sobre la superficie de la Tierra, ocupa un espacio, y se caracteriza por tener horizontes o capas, que se diferencian del material inicial como resultado de las adiciones, pérdidas, translocaciones y transformaciones de energía y materia o porque es capaz de sostener el enraizamiento de las plantas de manera natural.

Suelo salino. Un suelo no sódico que contiene suficientes sales para perjudicar su productividad. La conductividad de un extracto saturado es $>4\text{dS/m}$ y un $\text{pH} < 8.5$.

Suelo saturado. Suelo con todo su espacio poroso lleno de agua.

Suelo sódico. Suelo que contiene suficiente sodio para interferir con el crecimiento de la mayor parte de las plantas.

Superficie específica. La superficie de una partícula sólida por unidad de masa o volumen de la misma partícula sólida.

Suspensión. Mezcla heterogénea de sustancias constituida por un sólido fino disperso en un líquido.

Textura. Distribución de las proporciones de arenas, limos y arcillas de un suelo. Se determina en la fracción fina del suelo (< 2 mm de diámetro).

Titulación (valoración ácido-base). Método de análisis cuantitativo que permite determinar la concentración de una disolución ácida o básica desconocida, mediante una neutralización controlada.

Turba. Material del suelo no consolidado consistente en materia orgánica sin descomponer o parcialmente descompuesta, acumulada en condiciones de exceso de humedad.

Valoración ácido-base. Ver titulación.

Bibliografía

- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I. y Garbisu, C. (2003). Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on environmental health*, 18(1), 65-73.
- Amijee, F., Tinker, P. B. y Stribley, D. P. (1989). The development of endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytologist*, 111, 435-446.
- Amundson, R. (2001). The carbon budget in soils. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 29(1), 535-562.
- Anaya, C. A., García-Oliva, F. y Jaramillo, V. J. (2007). Rainfall and labile carbon availability control litter nitrogen dynamics in a tropical dry forest. *Oecologia*, 150(4), 602-610.
- Arshad, M. A. y Martin, S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88(2), 153-160.
- Askari, M. S. y Holden, N. M. (2014). Indices for quantitative evaluation of soil quality under grassland management. *Geoderma*, 230-231, 131-142.
- Barberá, O. y Valdés, P. (1996). El trabajo práctico en la enseñanza de las ciencias: una revisión. *Enseñanza de las ciencias: revista de investigación y experiencias didácticas*, 14(3), 365-379.
- Barbercheck, M., Neher, D., Anas, O., El-Allaf, S. y Weicht, T. (2009). Response of soil invertebrates to disturbance across three resource regions in North Carolina. *Environmental Monitoring Assessment*, 152, 283-298.
- Bardgett, R. D. y van der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515, 505-511.
- Barea, J. M., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. y Azcón, R. (2008). Mycorrhizal symbiosis en P. J. White y J. P. Hammond (eds.), *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (pp. 143-163). Springer Dordrecht.
- Batjes, N. H. (2014). Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science*, 65(1), 10-21.
- Bedano, J. C., Cantú, M. P. y Doucet, M. E. (2005). Abundance of Soil Mites (Arachnida: Acari) in a Natural Soil of Central Argentina. *Zoological Studies*, 44(4), 505-512.
- Behan-Pelletier, V. M. (1999). Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 411-423.
- Bekku, Y., Koizumi, H., Oikawa, T. e Iwaki, H. (1997). Examination of four methods for measuring soil respiration. *Applied Soil Ecology*, 5(3), 247-254.
- Berg, B. (2000). Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*, 133(1-2), 13-22.
- Bergaya, F., Lagaly, G. y Vayer, M. (2006). Cation and anion exchange en F. Bergaya, B. K. G. Theng, y G. Lagaly (eds.), *Handbook of clay science* (pp. 979-1001). Elsevier.
- Binkley, D. y Fisher, R. (2012). *Ecology and management of forest soils*. John Wiley and Sons.
- Bradford, M. A., Wieder, W. R., Bonan, G. B., Fierer, N., Raymond, P. A. y Crowther, T. W. (2016). Managing uncertainty in soil carbon feedbacks to climate change. *Nature Climate Change*, 6(8), 751-758.
- Brady, N. C. y Weil, R. (2013). *The Nature and properties of soils*. Pearson.
- Brevik, E. C., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., Pereg, L., Quinton, J. N., Six, J. y Van Oost, K. (2015). The interdisciplinary nature of soil. *Soil*, 1(1), 117-129.
- Bronick, C. J. y Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124, 3-22.
- Brundrett, M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79(3), 473-495.

BIBLIOGRAFÍA

- Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., de Deyn, G., de Goede, R., Fleskens, L., Geissen, V., Kuyper, T., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., van Groenigen, J. W. y Brussaard, L. (2018). Soil quality—A critical review. *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D. y Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216-234.
- Burns, R. G. y Dick, R. P. (2002). *Enzymes in the environment*. CRC Press.
- Chang, M. (2012). *Forest hydrology: an introduction to water and forests*. CRC Press.
- Chapin III, F. S., Matson, P. A. y Vitousek, P. M. (2014). *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer.
- Chávez-Ortiz, P. (2017). *Efecto del uso del glifosato en la dinámica de nutrientes y actividad microbiana de suelos agrícolas en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila* [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Morelia].
- Coleman, D. C. y Wall, D. H. (2015). Soil fauna: occurrence, biodiversity and roles in ecosystem function en E. A. Paul (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 112-149). Academic Press.
- Colwell, R. K. (2009). Biodiversity: concepts, patterns, and measurement en S. A. Levin (ed.), *The Princeton Guide to Ecology* (pp. 257-263). Princeton University Press.
- Dalpé, Y. y Hamel, C. (2008). Arbuscular mycorrhizae en M. R. Carter y E. G. Gregorich (eds.), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 355-377). CRC Press.
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bâ, A. y Johnson, N. C. (2015). Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, 349, 970-973.
- De Gryze, S., Six, J., Paustian, K., Morris, S. J., Paul, E. A. y Merckx, R. (2004). Soil organic carbon pool changes following land-use conversions. *Global Change Biology*, 10(7), 1120-1132.
- Delgado-Baquerio, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., Singh, B. K. y Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359, 320-325.
- Dindal, D. L. (1990). *Soil Biology Guide*. John Wiley and Sons.
- Dyhrman, S. T., Ammerman, J. W. y Van Mooy, B. A. (2007). Microbes and the marine phosphorus cycle. *Oceanography*, 20(2), 110-116.
- Egashira, K., Kaetsu, Y. y Takuma, K. (1983). Aggregate stability as an index of erodibility of Ando soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 29(4), 473-481.
- Elliott, E. T., Heil, J. W., Kelly, E. F. y Monger, H. C. (1999). Soil structural and other physical properties en G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe y P. Sollins (eds.), *Standard soil methods for long-term ecological research* (Vol. 2, pp. 74-85). Oxford University Press.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2009). *Guía para la descripción de suelos* (R. Vargas Rojas, Trad.). FAO.
- Field, D. J., Koppi, A. J., Jarrett, L. E., Abbott, L. K., Cattle, S. R., Grant, C. D., McBratney, A. B., Menzies, N. W. y Weatherley, A. J. (2011). Soil science teaching principles. *Geoderma*, 167, 9-14.
- Flores, L. y Alcalá, J. (2010). *Manual de procedimientos analíticos: laboratorio de física de suelos*. Departamento de Edafología, Instituto de Geología-Universidad Nacional Autónoma de México.
- Flores, J., Caballero-Sahelices, M. C. y Moreira, M. A. (2009). El laboratorio en la enseñanza de las ciencias: Una visión integral en este complejo ambiente de aprendizaje. *Revista de investigación*, 33(68), 75-111.
- Frossard, E., Condrón, L. M., Oberson, A., Sinaj, S. y Fardeau, J. C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of Environmental Quality*, 29, 15-23.

- Galloway, J. N. y Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 64-72.
- García-Palacios, P., Maestre, F. T., Kattge, J. y Wall, D. H. (2013). Climate and litter quality differently modulate the effects of soil fauna on litter decomposition across biomes. *Ecological Letters*, 16(8), 1045-1053.
- Gartner, T. B. y Cardon, Z. G. (2004). Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. *Oikos*, 104(2), 230-246.
- Gelman F., Binstock R. y Halicz, L. (2012). Application of the Walkley-Black titration for organic carbon quantification in organic rich sedimentary rocks. *Fuel*, 96, 608-610.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2), 235-244.
- German, D. P., Weintraub, M. N., Grandy, A. S., Lauber, C. L., Rinkes, Z. L. y Allison, S. D. (2011). Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(7), 1387-1397.
- Germida, J. J. y de Freitas, J. R. (2008) Cultural methods for soil and root-associated microorganisms en M. R. Carter y E. G. Gregorich (eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. CRC Press.
- Grace, E. J., Smith, F. A. y Smith, S. E. (2009). Deciphering the arbuscular mycorrhizal pathway of P uptake in non-responsive plant species en C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, S. Gianinazzi y V. Gianinazzi-Pearson (eds.), *Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact* (pp. 89-106). Springer Berlin.
- Guillen, C., Soto-Adames, F. y Springer, M. (2006). Variables físicas, químicas y biológicas del suelo sobre las poblaciones de colémbolos en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 30(2), 19-29.
- Hanson, P. J., Edwards, N. T., Garten, C. T. y Andrews, J. A. (2000). Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: a review of methods and observations. *Biogeochemistry*, 48(1), 115-146.
- Hao, X., Cho, C. M., Racz G. J. y Chang, C. (2002). Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64, 213-224.
- Harrison, M. J. (1997). The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in plant science*, 2(2), 54-60.
- Hartemink, A. E., Balks, M. R., Chen, Z. S., Drohan, P., Field, D. J., Krasilnikov, P., Lowe, D. J., Rabenhorst, M., van Rees, K., Schad, P., Schipper, L. A., Sonneveld, M. y Walter, C. (2014). The joy of teaching soil science. *Geoderma*, 217, 1-9.
- Hayes, J. E., Richardson, A. E. y Simpson, R. J. (2000). Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils*, 32(4), 279-286.
- Hazelton, P. y Murphy, B. (2007). *Interpreting soil test results: What do all the numbers mean?* CSIRO publishing.
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B. y Chauhan, B. S. (1982). Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 970-976.
- Hernández-Cuevas, L. V., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallen, I. y Ramos-Zapata, J. (2008). Micorriza arbuscular. Colonización intrarradical y extracción de esporas del suelo en J. Álvarez-Sánchez y A. Monroy (eds.), *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. Prensas de Ciencias.
- Hillel, D. (2003). *Introduction to environmental soil physics*. Elsevier.
- Hirsch, P. R. (2019). Microorganisms cycling soil nutrients en J. D. van Elsas, J. T. Trevors, A. S. Rosado y P. Nannipieri (eds.), *Modern Soil Microbiology* (pp. 179-194). CRC Press.

- Hollan, E.A., Robertson, G.P., Greenberg, J., Groffman, P.M., Boone, R.D. y Gosz, J.R. (1999). Soil CO₂, N₂O, and CH₄ exchange en G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe y P. Sollins (eds.), *Standard soil methods for long-term ecological research* (pp. 185-201). Oxford University Press.
- Hopkins, D. W. (2008). Carbon mineralization en M. R. Carner y E. G. Gregorich (eds.), *Soil sampling and methods of analysis* (pp. 589-598). CRC Press.
- Horneck, D. A., Sullivan, D. M., Owen, J. S. y Hart, J. M. (2011). *Soil test interpretation guide*. Oregon State University.
- Horwath, W. (2015). Carbon Cycling: The dynamics and formation of organic matter en E. A. Paul (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 339-382). Academic Press.
- Houghton, R. A. (2009). Terrestrial Carbon and Biogeochemical Cycles en S. A. Levin (ed.), *The Princeton Guide to Ecology*. Princeton University Press.
- Iraola, V. (2001). Introducción a los ácaros (II): Hábitats e importancia para el hombre. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 28, 141-146. Disponible en: <<http://entomologia.rediris.es/aracnet/7/10acaros/index.htm>>.
- Iturrondobeitia, J., Caballero, A. y Arroyo, J. (2004). Avances en la utilización de los Ácaros Oribátidos como indicadores de las condiciones edáficas. *Munibe*, 21, 70-91.
- IUSS, Grupo de Trabajo WRB (International Union of Soil Sciences). (2007). *Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007*. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO.
- Jiménez-Álvarez, L. S., Vega, N., Capa Mora, E. D., Fierro Jaramillo, N. D. C. y Quichimbo Miguitama, P. (2019). Estilos y estrategia de enseñanza-aprendizaje de estudiantes universitarios de la Ciencia del Suelo. *Revista electrónica de investigación educativa*, 21.
- Jiménez-Ruiz, S. (2009). La importancia de los recursos didácticos en la enseñanza. Temas para la Educación. *Revista digital para profesionales de la enseñanza*, 4, 1-6.
- Jobbágy, E. G. y Jackson, R. B., (2000). The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecological Applications*, 10, 423-436.
- Kandeler, E. (2007). Biochemical methods for studying soil biota and their function en E. A. Paul (ed.) *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 53-83). Academic Press.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F. y Schuman, G. E. (1997). Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal*, 61, 4-10.
- Karyanto, A., Rahmadi, C., Franklin, E., Susilo, F. y Wellington de Morais, J. (2012). Collembola, acari y otra mesofauna del suelo: el método Berlese en F. M. S. Moreira, E. Jeroen-Huising y D. E. Bignell (eds.), *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo el suelo* (pp. 149-162). Instituto Nacional de Ecología.
- Kemper, W. D. y Rosenau, R. C. (1986). Aggregate stability and size distribution en A. Klute (ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Kennedy, A. C. y Stubbs, T. L. (2006). Soil microbial communities as indicators of soil health. *Annals of arid zone*, 45(3/4), 287.
- Kivlin, S. N., Hawkes, C. V. y Treseder, K. K. (2011). Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11), 2294-2303.
- Klute, A. (1986). Water retention: laboratory methods en A. Klute (ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Koehler, H. (1992). The use of soil mesofauna for the judgement of chemical impact on ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 40, 193-205.

- Köhl, L., Lukaszewicz, C. E. y van der Heijden, M. G. (2016). Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, cell and environment*, 39(1), 136-146.
- Krantz, G. W. y Walter, D. E. (2009). *A Manual of Acarology*. (3ª ed.) Texas Tech University Press.
- Krzic, M., Yates, T. T., Basiliko, N., Pare, M. C., Diochon, A. y Swallow, M. (2018). Introductory soil courses: a frontier of soil science education in Canada. *Canadian Journal of Soil Science*, 98(2), 343-356.
- Kuo, S. (1996). Phosphorus en D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston y M. E. Sumner (eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Lavelle, P. y Spain, A. V. (2001). *Soil ecology*. Kluwer Academic Publishers.
- Likens, G. E. (2012). *Biogeochemistry of a forested ecosystem*. Springer.
- Lima, A. C. R., Brussaard, L., Totola, M. R., Hoogmoed, W. B. y de Goede, R. G. M. (2013). A functional evaluation of three indicator sets for assessing soil quality. *Applied Soil Ecology*, 64, 194-200.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Barrachina, C., Berlanga, M., Gonzalo, M., Díaz, C. y Ruiz-Berraquero, F. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Blackwell.
- Maltby, L. (1999). Studying stress: The importance of organism-level responses. *Ecological Applications*, 9, 431-440.
- Marschner, P. (2008). The role of rhizosphere microorganisms in relation to P uptake by plants en P. J. White y J. P. Hammond (eds.), *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions* (pp. 165-176). Springer.
- McBratney A. B., Field, D. J., Morgan, C. L. S. y Jarrett L. E. (2016). Soil security: a rationale en D.J. Field, C.L. Morgan y A. B. McBratney (eds.), *Global Soil Security* (pp. 3-14). Springer.
- Melillo, J. M., Frey, S. D., DeAngelis, K. M., Werner, W. J., Bernard, M. J., Bowles, F. P. y Grandy, A. S. (2017). Long-term pattern and magnitude of soil carbon feedback to the climate system in a warming world. *Science*, 358(6359), 101-105.
- Montaño, N. M., García-Oliva, F. y Jaramillo, V. J. (2007). Dissolved organic carbon affects soil microbial activity and nitrogen dynamics in a Mexican tropical deciduous forest. *Plant and Soil*, 295(1-2), 265-277.
- Morón, J. A. (2014). *Degradación de N-fosfometil glicina (glifosato) por bacterias edáficas de Cuatro Ciénegas, Coahuila* [Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia].
- Mosse, B. (1959). Observations on the extra-matrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Transactions of the British Mycological Society*, 42, 439-448.
- Mosse, B. y Jones, G. W. (1968). Separation of endogone spores from organic soil debris by differential sedimentation on gelatin columns. *Transactions of the British Mycological Society*, 51, 604.
- Mukherjee, A. y Lal, R. (2014) Comparison of Soil Quality Index Using Three Methods. *PLoS ONE* 9(8), 105981.
- Mulvaney, R. L. (1996). Nitrogen: Inorganic forms en D. L. Sparks (ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Munsell color (2015). *Munsell soil color book*. Xrite.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G. y Marinari, S.A.R.A. (2012). Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and fertility of soils*, 48(7), 743-762.
- Nelson, D. W. y Sommers L. E. (1996). Total carbon, organic carbon, and organic matter en D. L. Sparks (ed.), *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.

BIBLIOGRAFÍA

- Nicolson, T. H. (1959). Mycorrhiza in the Gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Transactions of the British Mycological Society*, 42, 421-438.
- Nimmo, J. R. y Perkins, K. S. (2002). Aggregate stability and size distribution en J. H. Dane y G. C. Topp (eds.), *Methods of soils analysis: Part 4 Physical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Oades, J. M. y Waters, A. G. (1991). Aggregate hierarchy in soils. *Australian Journal of Soil Research*, 29, 815-828.
- Osman, K. T. (2013). *Soils: principles, properties and management*. Springer Science and Business Media.
- Palacios-Vargas, J. G., Mejía-Recamier, B. E. y de Oyarzabal, A. (2014). *Guía ilustrada para los artrópodos edáficos*. Prensas de Ciencias. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/286450834_Guia_ilustrada_para_los_Artrópodos_Edaficos>.
- Parisi, V., Menta, C., Gardi, C., Jacomini, C. y Mozzanica, E. (2005). Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 105, 323-333.
- Paul, E. A. (2015). Soil Microbiology, ecology and biochemistry: an exciting present and great future built on basic knowledge and unifying concepts en E. A. Paul (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 1-14). Academic Press.
- Paul, E. A. y Clark, F. E. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.
- Pell, M., Stenstróm, J. O. H. N. y Granhall, U. (2005). Soil Respiration en J. Bloem, D. W. Hopkins y A. Benedetti (eds.), *Methods for assessing soil quality* (pp. 117-126). CABI.
- Phillipot, L., Renault, P., Sierra, J., Henault, C., Clays-Josserand, A., Chenu, C., Chaussod, R. y Lensi, R. (1997). Dissimilatory nitrite-reductase provides a competitive advantage to *Pseudomonas* sp. RTC01 to colonise the centre of soil aggregates. *FEMS Microbiology Ecology*, 21, 175-185.
- Phillips, J. M. y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Raich, J. W. y Schlesinger, W. H. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus B*, 44(2), 81-99.
- Raich, J. W. y Tufekciogul, A. (2000). Vegetation and soil respiration: correlations and controls. *Biogeochemistry*, 48(1), 71-90.
- Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1017-1023.
- Rhoades, J. D. (1996). Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids en D. L. Sparks (ed.). *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical Methods*. Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Robertson, P. G., Sollins, P., Ellis, B. G. y Lajtha, K. (1999). Exchangeable ions, pH and cation exchange capacity en G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe y P. Sollins (eds.) *Standard soil methods for long-term ecological research* (pp. 106-114). Oxford University Press.
- Ruttenberg, K. C. (2003). The global phosphorus cycle en H. D. Holland y K. K. Turekian (eds.). *Treatise on geochemistry* (pp. 585-643). Elsevier.
- Sánchez de Prager, M., Posada Almanza, R., Velásquez Pomar, D. y Narváez Castillo, M. (2010). *Metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular*. Taller de publicaciones Divulgación Académica y Cultural. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Sánchez-Marañón, M. (2011). La medida de la respiración del suelo como herramienta docente en edafología. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 2(3), 26-37.

- Sarkar, D. y Haldar, A. (2005). Physical and chemical methods in soil analysis. New Age International.
- Schlesinger, W. (2000). *Biogeoquímica. Un análisis al cambio global*. Ariel.
- Schlesinger, W. H. y Andrews, J. A. (2000). Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*, 48(1), 7-20.
- Schlesinger, W. H. y Bernhardt, E. S. (2013). *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Academic Press.
- Schoenholtz, S. H., Van Miegroet, H. y Burger, J. A. (2000). A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest ecology and management*, 138(1-3), 335-356.
- Schroeder, L. (1974). Buffon's needle problem: an exciting application of many mathematical concepts. *Mathematics Teacher*, 67, 183-186.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2002). "Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis". *Diario Oficial de la Federación*. 31/12/2002. Disponible en <<http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>>.
- Shaw, R. J. (1999). Soil salinity – electrical conductivity and chloride en K. I. Peverill, L. A. Sparrow y D. J. Reuter (eds.). *Soil analysis: an interpretation manual* (pp. 129-144). CSIRO Publishing.
- Shaw, L. J. y Burns, R. G. (2006). Enzyme activity profiles and soil quality en J. Bloem, D. W. Hopkins y A. Benedetti (eds.) *Microbiological methods for assessing soil quality* (pp. 158-182). CABI Publishing.
- Siebe, C., Jahn, R. y Stahr, K. (2006). *Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos y campo, 2a. ed.* Serie de Publicaciones Especiales de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo.
- Sikora, F. J., Crouse, K. K., Heckendorn, S., Huluka, G., Mitchell, C. C., Moore, K. P. y Oldham, J. L. (2014). Cation Exchange Capacity en F. J. Sikora y K. P. Moore (eds.) *Soil test methods from the southeastern united states* (pp. 170-180). Southern Cooperative Series Bulletin No. 419.
- Sims, J. T. (1996). Lime requeriments en D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston y M. E. Sumner (eds.), *Methods of soil analysis. Part 3: Chemical methods* (pp. 491-515). Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Sims, J. R. y Jackson, G. D. (1971). Rapid analysis of soil nitrate with chromotropic acid. *Soil Science Society of America, Proceedings*, 35, 603-606.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S. y Denef, K. (2004). A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79(1), 7-31.
- Slavich, P. G. y Petterson, G. H. (1993). Estimating the electrical conductivity of saturated paste extracts from 1:5 soil, water suspensions and texture. *Soil Research*, 31(1), 73-81.
- Smith, K. A. y Mullins C. E. (2000). *Soil and environmental analysis: physical methods, revised, and expanded*. CRC Press.
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.
- Smith, F. A. y Smith, S. E. (1997). Structural diversity in (vesicular)–arbuscular mycorrhizal symbioses. *The New Phytologist*, 137(3), 373-388.
- Smith, G. W. y Skipper, H.D. (1979). Comparison of methods to extract spores of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 722-725.
- Soil Survey Staff. (2014). *Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations Report No. 51, Version 2.0*. U.S. Department of Agriculture
- Sposito, G. (2008). *The chemistry of soils*. (2ª ed.). Oxford University Press.

BIBLIOGRAFÍA

- Stockmann, U., Adams, M. A., Crawford, J. W., Field, D. J., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A. B., Remy de Courcelles, V., Singha, K., Wheelera, I., Abbott, L., Angers, D. A., Baldock, J., Birde, M., Brookes, P. C., Chenug, C., Jastrow, J. D., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A. G., Parton, W. J., Whitehead, D. y Zimmermann, M. (2013). The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 164, 80-99.
- Sumner, M. E. y Miller, W. P. (1996). Cation exchange capacity and exchange coefficients en D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston y M. E. Sumner (eds.), *Methods of soil analysis. Part 3: Chemical methods* (pp. 1201-1229). Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Sutton, J. C. y Barron, G. L. (1972). Population dynamics of *Endogone* spores in soil. *Canadian Journal of Botany*, 50, 1909-1914.
- Swift, M. J., Heal, O. W. y Anderson, J. M. (1979). *Decomposition in terrestrial ecosystems*. University of California Press.
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M., (1969). Use of p-Nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
- Tan, K. H. (2010). *Principles of soil chemistry*. CRC Press.
- Tapia-Torres, Y., Elser, J. J., Souza, V. y García-Oliva, F. (2015). Ecoenzymatic stoichiometry at the extremes: How microbes cope in an ultra-oligotrophic desert soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 87, 34-42.
- Tapia-Torres, Y., Rodríguez-Torres, D., Islas, A., Elser, J. J., Souza, V., García-Oliva, F. y Olmedo Álvarez, G. (2016). How to live with phosphorus scarcity in soil and sediments: lessons from bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4652-4662.
- Thies, J. E. (2006). Measuring and assessing soil biological properties en N. Uphoff, A. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. H. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga y J. Thies (eds.), *Biological approaches to sustainable soil systems* (pp. 655-670). CRC Press.
- Thomas, G. W. (1996). Soil pH and soil acidity en D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston y M. E. Sumner (eds.), *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods* (pp. 475-490). Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.
- Tisdall, J. M. y Oades, J. (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *European Journal of soil science*, 33(2), 141-163.
- Tommerup, I. C. y Kidby, D. K. (1979). Preservation of spores vesicular-arbuscular endophytes by L-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 831-835.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2010). *Microbiology an introduction*. Pearson.
- Townsend, A. R., Howarth, R. W., Bazzaz, F. A., Booth, M. S., Cleveland, C. C., Collinge, S. K. y Mallin, M. A. (2003). Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(5), 240-246.
- van Reeuwijk, L. P. (1993). *Procedures for soil analysis (No. 9)*. International Soil Reference and Information Centre.
- Varoney, R. P. (2007). The soil habitat en E. A. Paul (ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 15-39). Academic Press.
- Verchot, L. y Borelli, T. (2005). Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 625-633.
- Wallwork, J. A. (1976). *The distribution and diversity of soil fauna*. Academic Press.
- Warcup, J. H. (1957). Studies in the occurrence and activity of fungi in a wheat-field soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 40, 237-259.

- White, R. E. (2006). *Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource* (4ª ed.). Blackwell.
- Wurst, S., De Deyn, G. y Orwin, K. (2012). Soil Biodiversity and Functions en D. H. Wall, R. D. Bardgett, V. Behan-Pelletier, J. E. Herrick y H. T. Jones (eds.), *Soil Ecology and Ecosystem Services* (pp. 28-44). Oxford University Press.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.
- Zibilske, L. M. (1994). Carbon mineralization en R. W. Weaver, S. Angle y P. Bottomley (eds.), *Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties* (pp. 836-863). Soil Science Society of America-American Society of Agronomy.

AVISO LEGAL

Catalogación en la publicación UNAM. Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de Información

Nombres: Anaya Merchant, Carlos Antonio, editor, autor. | Chávez Ortiz, Pamela, autor. | Hernández y Hernández, Dainiz, autor. | Morón Cruz, Alberto, autor. | Ojeda Carrasco, Margarita, autor. | Razo Pérez, Neftalí, autor. | Tapia Torres, Yunuen, autor.

Título: Métodos de laboratorio para el análisis de suelos / Carlos Antonio Anaya Merchant (coordinador); autores: Carlos Antonio Anaya Merchant, Pamela Chávez Ortiz, Dainiz Hernández y Hernández, Alberto Morón Cruz, Margarita Ojeda Carrasco, Neftalí Razo Pérez, Yunuen Tapia Torres.

Descripción: Morelia, Michoacán : Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Morelia, 2024.

Identificadores: LIBRUNAM 2229791 (libro electrónico) | ISBN (libro electrónico): 978-607-30-8781-0.

Temas: Suelos — Análisis — Manuales de laboratorio. | Química agrícola — Metodología.

Clasificación: LCC S587.25 (libro electrónico) | DDC 631—dc23

Métodos de laboratorio para el análisis de suelos de Carlos Antonio Anaya Merchant (coordinador), la publicación de esta obra ha sido posible gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por medio del Programa de Apoyo a proyectos para la Innovación y Mejoramientos de la Enseñanza (PAPIME), a través del proyecto PE214317 “Manual de prácticas de laboratorio para ecología de suelos” adscrito a la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Morelia.

La edición electrónica de un ejemplar (8.3 MB) fue preparada por el Área Editorial de la ENES, Unidad Morelia. Se utilizó en su composición la familia de fuentes Garamond y NewsGoth BT.

El cuidado editorial estuvo a cargo de Cecilia López Ridaura, Juan Benito Artigas Albarelli, Evelyn Tiamat Vázquez Priego. Su portada, diseño y formación fue realizado por Eduardo González Palacios.

Primera edición electrónica en formato PDF: 13 de marzo de 2024.

D. R. © 2024. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México.

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES Unidad Morelia.

Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Col. Ex Hacienda de San José de la Huerta,

C. P. 58190, Morelia, Michoacán.

ISBN: 978-607-30-8781-0.

Los contenidos de esta obra fueron analizados con un software de similitudes, por lo que cumplen plenamente con los estándares científicos de integridad académica. Asimismo, fueron evaluados por un proceso de arbitraje doble ciego y aprobados para su publicación por el Comité Editorial de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, unidad Morelia de la UNAM, y cumplen con los estándares de calidad en la investigación.

Esta edición y sus características son propiedad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio sin autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Hecho en México.