

III

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y PUESTA A
PUNTO DE MÉTODOS DE VALORACIÓN
DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
SUELO**

**FINCA “COTO BAJO DE MATALLANA”
CAMPAÑA 2004-2005
EXMA. DIPUTACIÓN PROVINCIAL DE VALLADOLID
INEA**

**Clara Vázquez de Prada
Jesús de Torres Villagrà**

ÍNDICE

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. OBJETIVOS**
- 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE MÉTODOS**
- 4. MATERIAL Y MÉTODO**
- 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
- 6. CONCLUSIONES**

1. INTRODUCCIÓN

El presente estudio se realiza en el marco del acuerdo entre la Excm. Diputación Provincial de Valladolid e INEA, por el cual esta última se compromete a llevar la dirección técnica de la finca "Coto Bajo de Matallana" en sus aspectos agrícolas, y orientarla hacia la producción ecológica.

Además de la transformación general de la finca a una agricultura ecológica, se están llevando a cabo una serie de ensayos de variedades y de técnicas de cultivo para optimizar la producción ecológica de secano.

Aprovechando estos ensayos, se lleva a cabo una monitorización de la flora arvensis así como de la composición química del suelo para estudiar su evolución como consecuencia de las prácticas ecológicas.

El equipo técnico de INEA ha estimado de interés añadir a estos controles el de la evolución de la actividad biológica del suelo como indicador de la fertilidad.

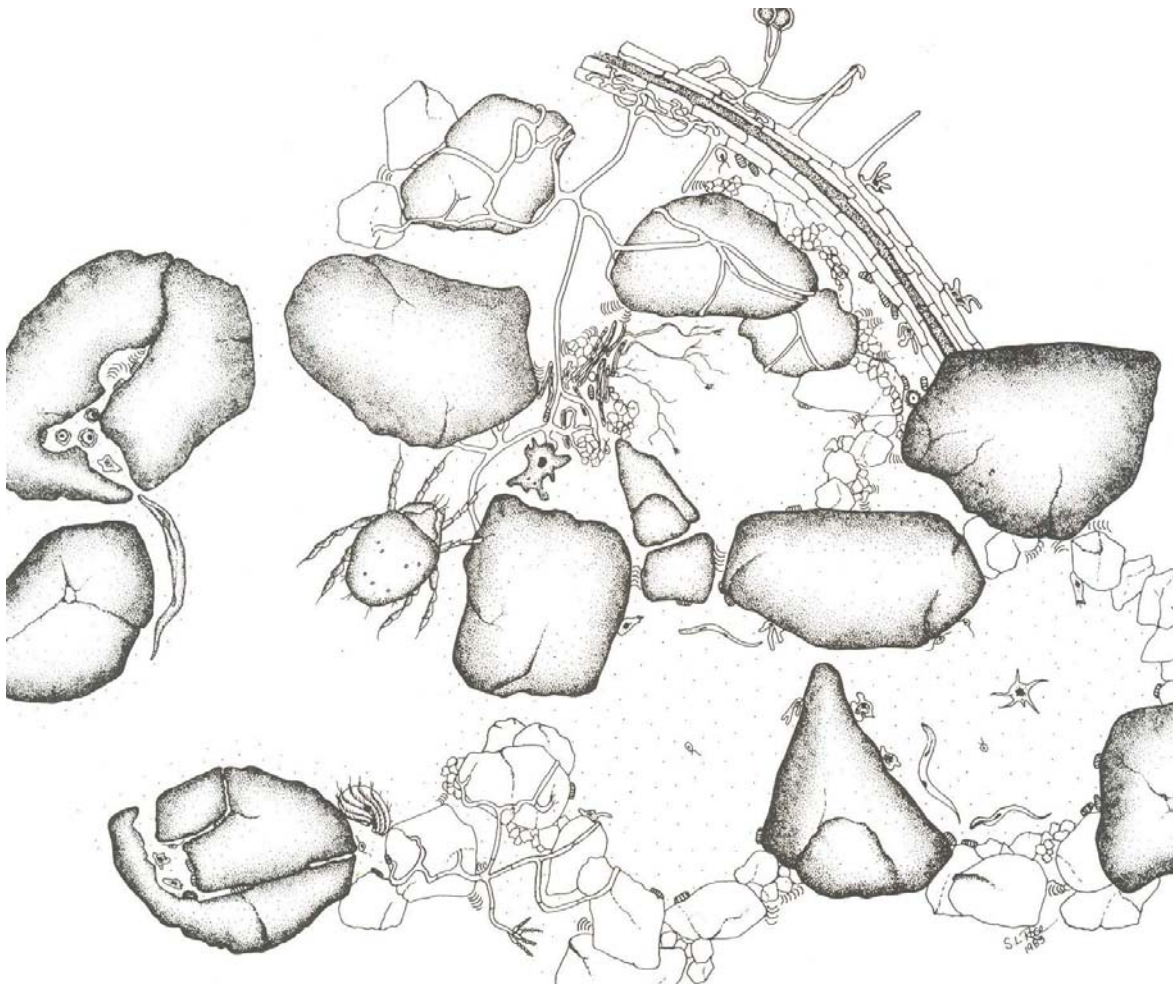


Figura 1. Dibujo esquemático de los diversos tipos de organismos que pueblan un suelo fértil, aumentado unas 100 veces

El suelo tiene funciones diversas y muy importantes para los ecosistemas y el medio ambiente del planeta. Es el sustento para la vida vegetal y del cual las plantas obtienen soporte mecánico y los nutrientes; es el hábitat para una gran diversidad, tanto de microorganismos (algas, bacterias, actinomicetos, arqueas, hongos, protozoarios, y virus), así como de macroorganismos (coleópteros, miriápodos, hormigas, colémbolos, nematodos, ácaros, larvas y mamíferos pequeños); es también el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte de los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas terrestres (mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación del nitrógeno y oxidación del metano entre otros).

Dada la gran diversidad biótica del suelo, se presentan interacciones muy complejas entre los diferentes organismos y, junto con los ecosistemas acuáticos, representa la base de la vida en este planeta .

La agricultura convencional altera de forma severa la estructura del suelo. La vertedera y otros sistemas de volteo del suelo exponen reiteradamente capas más o menos profundas de suelo a la acción de la intemperie. Los seres vivos allí presentes no pueden adaptarse a cambios tan repentinos en la cantidad de agua y oxígeno ni a la acción de los agentes mecánicos como el viento y la lluvia, y su presencia tiende a disminuir. En los suelos de regiones semiáridas como la meseta castellano-leonesa, la disminución de formas vivas va acompañada de una rápida mineralización de la materia orgánica que tiene como resultado la desestructuración y compactación del suelo con la correspondiente pérdida de fertilidad natural y de estabilidad en lo que se refiere a protección sanitaria de las raíces. Todo ello tiene como consecuencia el aumento de la dificultad para que puedan volver a implantarse las formas vivas perdidas en caso de que unas prácticas culturales más adecuadas lo permitan.

Resulta importante saber en qué medida la agricultura ecológica, en este caso concreto de secano semiárido, es capaz de restaurar la fertilidad natural de una condición edáfica concreta y a qué velocidad suceden los procesos que llevan a ella. La actividad biológica puede ser un indicador muy adecuado para esta tarea.

Aunque no puede decirse que un suelo que presenta gran actividad biológica sea automáticamente un suelo bueno o fértil, ya que la vida microbiana es activa en suelos pantanosos (J. Porta, M. López, C. Roquero 1999), si puede afirmarse, sin embargo, que no hay suelo verdaderamente fértil y estable si no tiene la adecuada actividad biológica.

Dada la enorme variedad de seres vivos presentes y activos en el suelo, su estudio detallado desde el punto de vista taxonómico, es tarea imposible como herramienta rutinaria. Es por ello que se han desarrollado en las últimas décadas numerosos sistemas que permiten valorar de forma global la cantidad de vida activa del suelo.

El presente estudio trata de identificar y poner a punto algunos de los métodos que ofrezcan mayores garantías, siguiendo los siguientes criterios:

- Fiabilidad
- Sencillez
- Que no requieran fuertes inversiones en instrumentación

Se tuvo además en cuenta la opinión de científicos del ramo.

2. OBJETIVOS

De la parte bibliográfica

1. Clasificar los métodos
2. Describir y esquematizar los más citados
3. Seleccionar los tres más acordes con las necesidades de nuestro estudio

De la parte experimental

1. Poner a punto los métodos seleccionados
2. Validar estadísticamente su repetibilidad y su fiabilidad

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y SELECCIÓN DE MÉTODOS

En las páginas siguientes se expone un resumen de los métodos encontrados en la bibliografía, con sus ventajas e inconvenientes

Tabla 1 : Métodos de determinación de la respiración del suelo

MÉTODO	AÑO	AUTORES	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Estimación de la respiración en sistema cerrado de incubación	1952 1976 1997	Isermeyer Jäggi Aoyama y Nagumo	<ul style="list-style-type: none"> • se hace un estudio periódico de las cantidades de CO₂ desprendido • se evitan los problemas de anaerobiosis 	<ul style="list-style-type: none"> • no sabemos la cantidad exacta de suelo ya que antes tenemos que saber la cantidad y estado de la materia orgánica del suelo a estudiar.
Medida de la actividad biológica			<ul style="list-style-type: none"> • la operación se realiza por duplicado teniendo una mejor visión del resultado • se puede valorar también un suelo enriquecido 	<ul style="list-style-type: none"> • cuando el tiempo de incubación es largo debemos permitir la aireación.
Estimación de la respiración en sistema de incubación con arrastre de aire	1969	Parr y Simth	<ul style="list-style-type: none"> • podemos valorar grandes cantidades de CO₂ desprendido sin sobreestimarlas gracias al arrastre de aire 	<ul style="list-style-type: none"> • es difícil que la cantidad de CO₂ que ha recogido de los botes de NaOH 4M las pueda recoger un frasco de NaOH 0.5M • la rehumectación puede dar una alta actividad inicial
Estimación de la respiración del suelo por medida directa del CO ₂			<ul style="list-style-type: none"> • fácil de realizar , ya que el aparato medidor de CO₂ nos realiza todo el método 	<ul style="list-style-type: none"> • debes tener el medidor de CO₂ • no sabemos la cantidad del suelo porque depende de la materia orgánica
Estimación automática del CO ₂ desprendido. Aparato Wösthoff	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • el aparato es capaz de medir 6 muestras a la vez • método fiable cuyo aparato es resistente y fácil 	<ul style="list-style-type: none"> • la célula de medida del aparato tiene que estar a una temperatura más o menos constante de 2°C • caro al necesitar el aparato
Estimación de la respiración por medida del O ₂ . Aparato Sapromat	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • se puede medir hasta 12 muestras • se evitan condiciones de anaerobiosis 	<ul style="list-style-type: none"> • método caro de realizar • no tienen en cuenta los seres anaerobios
Método de cámaras de respiración estática o cerradas	1986	Rolston	<ul style="list-style-type: none"> • el suelo no va a sufrir ninguna variación porque es in- situ 	<ul style="list-style-type: none"> • el aumento de la concentración de CO₂ la atmósfera del interior de la cámara puede alterar el gradiente de concentración en perfil del suelo causando una disminución del flujo de CO₂ en el periodo de medida
Método de absorción estática	1982 1995	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • ha sido utilizado por muchos científicos • método sencillo • método versátil 	<ul style="list-style-type: none"> • la fiabilidad del método ha sido muy discutida ya que conduce a la infraestimación de CO₂ cuando este es elevado y también cuando es baja.
Método de absorción dinámica	1961	Witkamp y Van der Drift	<ul style="list-style-type: none"> • el suelo no está modificado • este método mejora el contacto entre el CO₂ del aire de la cámara y la disolución álcali 	<ul style="list-style-type: none"> • puede haber diferencias de presión entre cámara y la fase gaseosa del suelo.
Método de cámara de respiración con flujo de aire	1982 1993	Anderson Alef	<ul style="list-style-type: none"> • la alteración del suelo es mínima • se usan 4 colectores siendo la muestra del suelo más representativa • no se arrastra CO₂ de los poros del suelo 	<ul style="list-style-type: none"> • hay que medir una muestra del aire ambiente en cada análisis de atmósfera de suelo

Tabla 2 : Métodos de medida de ATP

MÉTODO	AÑO	AUTOR	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Extracción del ATP	1984 1990 1979 1982 1983	Webster Ciardi y Nannipieri Jenkinson y Oades Tate y Jenkinson Eliand	<ul style="list-style-type: none"> • de todos los extractantes que se pueden utilizar saber que el más potente es el PA 	<ul style="list-style-type: none"> • debemos realizar la sonicación por el impedimento de extracción de las arcillas
Determinación del ATP extraído con PA y TCA				<ul style="list-style-type: none"> • necesitas tener luminómetro • hay que corregir el valor de ATP obtenido en ATP existente
Determinación del ATP extraído con H2SO4	1983	Eiland	<ul style="list-style-type: none"> • este tipo de técnicas han sido mejoradas por la purificación de la luciferasa 	<ul style="list-style-type: none"> • algunas sustancias liberadas del suelo por los extractantes pueden interferirse con la reacción luciferasa • necesidad de luminómetro
Método de determinación de ATP por cromatografía líquida de alta presión, HPLC	1992	Martens	<ul style="list-style-type: none"> • puede ser con el tiempo el método de futuro para medir el ATP del suelo, ya que evita problemas que presentan la bioluminiscencia 	<ul style="list-style-type: none"> • tiempo largo de análisis • costoso equipamiento

Tabla 3 : Métodos de la determinación del C y N

MÉTODO	AÑO	AUTOR	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Determinación del N y C de la biomasa microbiana por el método de fumigación-incubación	1976b	Jenkinson y Powelson	<ul style="list-style-type: none"> • el Kc ha sido muy estudiado esta muy estipulado • a partir de este método son muchos los tipos y maneras de calcular las diferentes determinaciones de C y N 	<ul style="list-style-type: none"> • suponemos que la incubación afecta a la biomasa microbiana y no a la materia orgánica • suponemos que el número de microorganismos muertos en el suelo no fumigado es inapreciable al comparar con fumigado • el Kn nos da problemas ya que depende del tipo de microorganismo • el cálculo de la C-biomasa suponemos que la velocidad de respiración de fumigados y no fumigados es la misma • no sirve para suelos ácidos
Determinación del C y N de la biomasa microbiana por el método de fumigación - extracción	1987	Vance	<ul style="list-style-type: none"> • este método proporciona buenos resultados para todo rango de pH de los suelos • método muy utilizado y que los científicos han ido poniendo y solucionando trabas que encontraban en el camino 	<ul style="list-style-type: none"> • el contenido de agua en los suelos debe ser alto (más que 30% de su capacidad de retención de agua) ya que en suelos secos los microorganismos no son afectados por el cloroformo • no se tiene en cuenta las raíces que son eliminadas • cantidades elevadas de cloruro en el suelo interfieren en la determinación del C orgánico
Determinación del C de biomasa microbiana por el método de la respiración inducida por sustrato	1978	Anderson Domsh	<ul style="list-style-type: none"> • tienen en cuenta los microorganismos que están latentes en el suelo • método que se ha modificado por diferentes científicos • tiene en cuenta las situaciones anaerobias • método rápido de realizar • no se emplean reactivos tóxicos 	<ul style="list-style-type: none"> • hay que calcular con exactitud la cantidad de glucosa a utilizar • no hay unanimidad en el factor de conversión de la respiración máxima iniciada • no resulta adecuado para pH > 6.5 • cuidado con suelos que han recibido algún sustrato ya que los microorganismos se encuentran en crecimiento exponencial

Tabla 4 : Métodos de la actividad enzimática (Autor)

MÉTODO	AÑO	AUTOR	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Determinación de la actividad arisulfatasa	1970	Tabatabai Bremner	<ul style="list-style-type: none"> • si contamos con el espectrofotómetro la medida es sencilla y rápida • la simplificación de Elsgaard nos da muchas más opciones a lo largo del procedimiento 	<ul style="list-style-type: none"> • necesidad del espectrofotómetro U-UV • necesidad de preparar una curva patrón
Determinación de la actividad arisulfatasa	1992	Wirth Wolf	<ul style="list-style-type: none"> • podemos calcular la actividad arisulfatasa tanto exo como endocelular. • la arisulfatasa se induce en condiciones de deficiencia de sulfato del suelo 	<ul style="list-style-type: none"> • necesidad de muchos aparatos lo cual generan un alto coste al método • método muy laborioso
Determinación de la actividad caseinaza	1972 1998 a	Ladd y Butler Bonmatí		<ul style="list-style-type: none"> • las muestras y los patrones tienen que estar a la misma temperatura con una diferencia de 1°C daría lugar a un error del 2% • las determinaciones del contenido de amoníaco deben ser realizadas inmediatamente • procedimiento laborioso y con la necesidad de muchos aparatos
Determinación de la actividad ureasa del suelo	1972 1978	Tabatabai y Bremner Nannipieri	<ul style="list-style-type: none"> • salvo el pH-metro los utensilios a utilizar son comunes 	<ul style="list-style-type: none"> • este método puede ser no fiable en suelo donde existan aminas volátiles hidracina, iones capaces de formar complejos o altas concentraciones de proteínas y albúminas. • hay que realizar curva de calibrado
Determinación de la actividad ureasa del suelo	1988 1999	Kandeler y Gerber Kandeler	<ul style="list-style-type: none"> • la determinación colorimétrica del amonio se caracteriza por alta sensibilidad y estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • necesidad de espectrofotómetro • la prueba de Berthelot para determinar el amonio presenta problemas como falsa actividad en presencia de antibióticos, inestabilidad y escasa sensibilidad
Determinación de la actividad ureasa por ensayos rápidos de microceldillas	2000	Sinsanbaugh	<ul style="list-style-type: none"> • es sensible, rápido y exacto • se puede analizar un número elevado de muestras 	<ul style="list-style-type: none"> • necesidad de espectrofotómetro • método muy moderno que podría ser una ventaja pero no se ha realizado tanto como los anteriores, y nadie ha podido ver problemáticas para una posterior modificación
Determinación de la actividad deshidrogenasa	1982 1993	Trevors García		<ul style="list-style-type: none"> • la actividad máxima de la deshidrogenasa consigue hasta los 75°C pero a esta temperatura desciende por la fracción húmeda del suelo. • la presencia de cobre interfiere en la medida • necesidad de espectrofotómetro
Determinación de la actividad deshidrogenasa	1991 1998	Mersi y Schinner Camiña	<ul style="list-style-type: none"> • método relativamente nuevo y ya modificado 	<ul style="list-style-type: none"> • no nos da un resultado fiable en suelos ácidos ya que la reducción del INT no está favorecida y la existencia de absorción del INTF, lo que provoca una subestimación

Elección de métodos

Siguiendo los criterios expuestos en la introducción:

- Fiabilidad
- Sencillez
- No necesitar instrumentación sofisticada

se seleccionaron los siguientes métodos

Para la determinación del C y N , se optó por el método de Fumigación – Incubación según Jenkinson y Powlson (1976). Ya que, para determinar la biomasa microbiana de manera indirecta (no mediante recuento al microscopio de los microorganismos existentes), es de los métodos más utilizados.

Para la medición de la respiración del suelo, se eligió el método de absorción estática de CO₂ en álcali (Anderson 1982; Alef 1995). Este método, se realiza directamente en campo, en un suelo sin alterar, es por eso que nos dará un valor más aproximado de la actividad biológica, ya que no se modifican las condiciones. Fue también interesante para su elección el que ha sido utilizado por diferentes científicos y que ha sufrido modificaciones hace relativamente poco (1995). Además, este método es sencillo y versátil, no teniendo que ser un gran conocedor de la química para poder realizarlo.

Por último para la determinación de la actividad enzimática del suelo, se optó por el método de la Determinación de la actividad ureasa del suelo por el método de Tabatabai y Bremner (1972) y modificada por Nannipieri (1978). Fue este método el elegido ya que esta enzima se encuentra distribuida en la naturaleza, en microorganismos, células animales y vegetales. La actividad ureasa es una de las enzimas más estudiadas junto con otro grupo de hidrolasas porque son enzimas básicas en estudios de calidad, fertilidad y en la evolución del impacto de contaminantes en el suelo. Y es que el interés por esta actividad se debe a su relación en el ciclo del N y por el uso de urea como fertilizante en la agricultura.

4. MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de los métodos , lo primero que se hizo fue escoger dos tipos de tierras, en este caso en la finca de INEA, en los cuales supuse que habría una diferencia de actividad biológica por el tipo de suelo y por el tipo de cultivo.

Por ellos se escogió tierra próxima al río, considerando que esta zona, al no estar muy cultivada y al estar cerca al río, presentaría una riqueza en actividad biológica “buena”. Para ello se cogió una bandeja de tierra hasta una profundidad de unos 10 cm, que es donde se puede encontrar con mayor facilidad microorganismos, al estar cerca de las raíces de las plantas.

En cambio, el otro tipo de suelo que se eligió fue detrás del edificio de INEA, cerca de la carretera ya que este suelo por haber sufrido cambios bruscos tanto por las obras (en su momento) así como los árboles que recientemente se han plantado y por ser una zona transitada y desgastada. Creímos “teóricamente” que sería una suelo pobre en cuanto actividad biológica se refiere. Por ello igual que en el caso anterior, se cogió una bandeja de tierra para su posterior tamizado.



Figura 2 : Bandeja con muestra de suelo

A la hora de explicar y poner los resultados, llamaremos al 1º tipo de suelo “zona río” y al 2º tipo de suelo “zona árboles” o “pedregal”

MÉTODO DE FUMIGACIÓN- INCUBACIÓN SEGÚN JENKINSON Y POWLSON (1976)

En este método las muestras de suelo se exponen a la acción fumigante del cloroformo, el cual supuestamente mata todo su contenido microbiano, y tras una reincubación con suelo no fumigado se determina la materia orgánica mineralizada durante una incubación, la cual, cuando se descuenta la medida de controles no fumigados, se admite que es proporcional a la biomasa microbiana

existente en la muestra antes de la incubación. Así, este método se realiza en tres pasos:

- Fumigación con cloroformo de las muestras,
- Incubación y
- Determinación analítica del C y o del N mineralizados.

Fumigación e incubación

Materiales y aparatos

- Desecadores de cristal de vacío.
- Bomba de vacío
- Gránulos para favorecer la ebullición
- Incubador
- Botellas de vidrio de uso normal en el laboratorio

Reactivos y disoluciones

- Cloroformo libre de etanol
- NaOH 1M

Procedimiento

El suelo se pasa a través de un tamiz de 6.25 mm, se homogeneiza y se ajusta su humedad hasta el 40-50% de su capacidad máxima de retención de agua. Se toman alícuotas conteniendo alrededor de 50 g de materia seca, tres de ellas para fumigar y tres como control y se colocan en vasos de precipitados dentro de un desecador de vacío, en el cual se ha dispuesto papel húmedo en su parte inferior .

Se coloca un vaso con 25 ml de CHCl_3 libre de etanol con unos gránulos favorecedores de la ebullición. Se aplica vacío hasta que el CHCl_3 hierva vigorosamente durante 2 min, tras lo cual se cierra la llave del desecador y se deja en un incubador a 25°C durante 24 h en la oscuridad. Al mismo tiempo se preparan de igual modo las muestras control no fumigadas, con la única diferencia de no colocar CHCl_3 en el desecador. Tras la incubación , las muestras fumigadas se disponen en desecadores secos y limpios y se evacua el CHCl_3 aplicando vacío hasta la desaparición del olor a CHCl_3 (unas 5 o 6 veces durante 2 min suele ser suficiente)

Tras la eliminación del CHCl_3 , las muestras fumigadas se inoculan con 1 g del suelo no fumigado. Todos los vasos de precipitados conteniendo las muestras fumigadas y controles se transfieren al mismo tiempo a botellas de vidrio cerradas herméticamente conteniendo 10 ml de agua en el fondo y un vaso con 20 ml de NaOH 1M para atrapar el CO_2 liberado, tras lo cual se incuban a 25°C durante 10 días. Se ponen a incubar blancos sin suelo también, es decir, se

pone todo igual, pero sin poner muestras con suelo. Al final del periodo de incubación se determina el C o el N de la biomasa microbiana muerta durante la fumigación y que ha sido mineralizada durante dicho periodo.

Determinación del C de la biomasa microbiana

El C de la biomasa microbiana se determina a través del incremento de CO₂ respirando de las muestras fumigadas frente a los controles. El CO₂ puede ser determinado mediante diferentes procedimientos analíticos usuales, tales como la determinación directa del CO₂ por valoración potenciométrica con pHmetro o colorimétrica con indicadores (Jenkinson y Powlson 1976b), determinación indirecta mediante precipitación del carbonato en presencia de BaCl₂ y valoración del álcali remanente (Anderson, 1982) , y también por métodos instrumentales como un analizador automático de carbono con detector de IR o un sistema de flujo continuo con detección colorimétrica. A continuación se describe uno de los métodos de valoración directa:

Materiales y apartados

Bureta
Agitador magnético
PHmetro

Reactivos y disoluciones

Ácido clorhídrico 1M
Ácido clorhídrico 0.1M
Anhidrasa carbónica (10mg de enzima en 10 ml de agua destilada)

Procedimiento

Tras la incubación, se toma una alícuota de 5 ml de la solución de NaOH 1M utilizada como trampa de CO₂ , se le añaden 20 ml de agua y unas gotas de la solución de anhidrasa carbónica, que permite detectar mejor el punto final de la valoración. El pH de la disolución de NaOH se lleva a 10 por adición lenta de HCl 1M y luego a pH 8.3 por adición lenta de HCL 0.1M. durante dichas adicciones de ácido se agita la disolución con un agitador magnético. Tras ello, se valora la disolución con HCl 0.1M hasta pH 3.7.

Para la realización de este método se siguieron los pasos de su protocolo:

1.- Tamizado

Para la realización de este método, necesitábamos 300 gr de suelo tamizado a 6.25mm. nuestro tamizado fue de 5mm, ya que los suelos eran bastante pedregosos, para tener una tierra más limpia.

2.- Homogeneización

Posteriormente se homogeniza el suelo tamizado, para que a la hora de coger la cantidad de tierra necesaria para las muestras no se tenga preferencia de tamaños de partículas.

3.- Preparar las alícuotas de las muestras

Después de haber homogeneizado, se van a coger alícuotas de 50gr, en este caso 6. Tres de ellas servirán para el proceso de fumigación, mientras que las otras tres nos servirán de controles. Y se colocan en vasos de precipitados.

4.- Ajustar a humedad 40-50% de su capacidad máxima de retención

Según la metodología a seguir para este método, el suelo tenía que tener una capacidad máxima de retención de 40-50%. Es decir, nuestras muestras tenían que estar humedad, y más aún en este año de sequía.

5.- Desecador de vacío con cloroformo.

En un desecador de vacío introducimos tres muestras de suelo (las que son para fumigar) , en el cual se ha dispuesto papel húmedo en su parte inferior y un vaso de precipitado con 25ml de cloroformo, libre de etanol con gránulos de ebullición. El cloroformo lo que hará es que los seres vivos que se encuentran en la muestra problema se mueran.



Figura 3 : Desecador de vacío

6.- Incubación

Una vez realizado lo anterior , se metió (con desecador incluido) las muestras en una estufa durante 24 horas y a 25°C en plena oscuridad. Esto se realiza por si queda algo de cloroformo en la placa de Petri , terminándose de evaporar y cerciorándose de que los organismos se hubiesen muerto.

7.- Desecador de vacío (Controles)

Se realiza otra vez, pero en este caso, al se controles no hace falta que esté en presencia el cloroformo. Al no tener aquí la referencia de cuanto tiempo tenía que estar el desecador de vacío enchufado en la bomba, se consideró conveniente y equitativo que estuviese 10 minutos al igual que las muestras fumigadas.

8.- Incubación de controles.

9.- Evacuación del cloroformo.

Las muestras que has sido fumigadas y que han permanecido durante un día en incubación, se las vuelve a conectar al a bomba de vacío y se repite la operación unas 5 o 6 veces para que el olor de cloroformo se vaya poco a poco. A los controles este proceso no es necesario al no contener cloroformo en su desecador.

10.- Inoculación

Las muestras de suelo fumigadas se van a inocular con 1 gramos de suelo no fumigado. Ya que los que realmente se va a medir con este método va a ser la cantidad de materia orgánica que nos vamos a poder encontrar en estas muestras fumigadas e inculadas después de una incubación, descontando la medida de la materia orgánica de los controles no fumigados.

10.- Preparación para la posterior incubación

Una vez inoculadas las muestras fumigadas, se transfieren los vasos de precipitados (tanto las muestras fumigadas como los controles) en tarros herméticos para que en el proceso de incubación no se vaya nada de la microatmósfera creada en el interior.

En estos tarros herméticos se introducen 10 ml de agua destilada en el fondo del tarro y en dos vasos de precipitado las muestras problema y 20 ml de NaOH 1M que su función va a ser la de atrapar el CO₂ expulsado por la muestra, para una posterior medición del C del mismo.



Figura 4 : tarros herméticos en el que se ven muestras de suelo y NaOH



Estos botes herméticos se vuelven a introducir en la estufa durante 10 días a 25°C. Este proceso se realiza tanto en las muestras fumigadas como en los controles.

Figura 5 : Tarros herméticos en la estufa (Autor)

11.- DETERMINACIÓN DEL CARBONO

Una vez que ha pasado el tiempo indicado los botes herméticos se sacan de la estufa y se procede a la medición del Carbono en las soluciones de NaOH 1M ; para poder llegar a determinar la actividad que nos encontramos en el suelo .

Para ello se tomó una alícuota de 5ml de NaOH 1M (que ha atrapado el CO₂ expulsado de la microatmósfera de los tarros) y se mezcla con 20ml de H₂O destilada.

Según el protocolo se podría echar anidrasa carbónica ya que detecta mejor el punto de valoración del pH, pero no se consideró necesario.

La primera valoración a realizar será con HCl 1M y se llevó la muestra de NaOH a pH 10 para ello utilizamos el agitador magnético , la bureta y el pH-metro para ir analizando las muestras.

La segunda valoración será llevar la disolución problema con HCl 0.1M a pH = 8.3 (con la misma técnica explicada anteriormente)

Y la tercera y última valoración será llevar la disolución de pH = 8.3 con HCl 0.1 M a pH = 3.7.

Se anotan los valores y se realizan los cálculos.

Figura 6 : valoración del NaOH mediante HCl



12. CÁLCULOS

$$C-CO_2 (\mu\text{g C.g}^{-1} \text{ suelo}) = \frac{(S - B) \times M \times P_m \times V}{G}$$

S = Volumen (ml) de HCl 0.1M gastado en las muestras de suelo para llevar el pH de la disolución de sosa desde 8.3 hasta 3.7.

B = Volumen (ml) de HCl 0.1M gastado en los blancos para llevar el pH de la disolución de sosa desde 8.3 hasta 3.7.

M = Molaridad exacta de la disolución de HCl 0.1M.

P_m = peso atómico del C (12).

V = Factor relativo a la dilución, y representa la relación entre el volumen total de la solución de NaOH y volumen de la alícuota usada la valoración (en este caso 4= 20/5)

G = Factor relativo al suelo seco usado en la experiencia, en g.

MÉTODO DE ABSORCIÓN ESTÁTICA DE ANDERSON (1982) Y ALEF (1995)

Este método ha sido utilizado por un gran número de investigadores (Witkamp, 1966; Van Cleve et al., 1990; Freijer y Bouten, 1991; raich y Schlesinger, 1992), y se basa en la absorción (por difusión) sobre álcali del CO₂ desprendido por un suelo sin alterar cubierto por una cámara cilíndrica, determinando a continuación , después de un tiempo determinado de medida, la concentración de CO₂ que ha reaccionado con el álcali.

Materiales y aparatos

Cámaras metálicas de respiración y viales de vidrio para contener el álcali, de altura y diámetro adecuados. Anderson (1982) indica que la cámara debe tener un diámetro mínimo de 25cm y al menos 30 cm de altura y los viales unos 7cm de altura y 6.5cm de diámetro. Sin embargo, Conant et al. (2000) emplean cámaras de respiración de 15.5cm de diámetro y 17cm de altura, introduciendo en ellas viales de 5.9cm de diámetro conteniendo 20 ml de KOH 1M.

Trípode de metal o plástico construido de modo que la base del frasco de vidrio quede a unos 2cm de la superficie del suelo.

Reactivos y disoluciones.

Disolución de NaOH o de KOH 1M

Disolución de HCl 1M

Indicador de fenolftaleína: 1 gramo de fenolftaleína se disuelve en 80 ml de etanol (95%) y se lleva a 1000ml con etanol (95%). Puede utilizarse otro indicador ácido-base.

Procedimiento

En la superficie del suelo se coloca sobre un trípode un vial conteniendo 20ml de NaOH 1M e inmediatamente se cubre con la cámara de respiración , presionando los bordes de la misma de modo que sus bordes queden introducidos en el suelo unos 2cm. El sistema debe protegerse de la acción directa del sol (por ejemplo cubriéndolo con papel de aluminio), y se deja el sistema en el lugar durante 24 horas; transcurrido este tiempo, se recoge el frasco de álcali, se tapa herméticamente y se lleva al laboratorio para análisis. Para nuevas medidas se traslada el cilindro a otra nueva superficie del suelo. Los controles consisten en cámaras herméticamente cerradas del mismo volumen que la anterior, conteniendo un vial con la misma cantidad de álcali, que se incuban en el campo en las mismas condiciones que las que cubre la superficie del suelo.

La realización de este método es directamente en campo, es por tanto el no haber sido preciso ni coger, ni tamizar suelo. Para este método hemos precisado de cámaras metálicas que según Anderson tenían que tener 25cm de diámetro y

30cm de altura; en cambio Conant decía que era mejor de 15.5cm de diámetro y 17cm de altura.

1.- REALIZACIÓN DE LAS CÁMARAS.

Nuestras cámaras, fueron más rudimentarias, siendo cubas de plástico cortadas, las cuales tenían un diámetro de 10cm y 35 cm de altura, para que estuviesen en las mismas condiciones que indicaba el protocolo se las envolvió en papel de albal. La función que tiene este papel es que el sol no afecte al proceso. Estas cámaras estarán introducidas en la tierra unos 2cm.

2.- REALIZACIÓN DE LOS TRÍPODES.

Dentro de las cámaras se colocarán unos trípodes para que el vial que más tarde colocaremos no este a ras del suelo, sino con una pequeña altura. Este trípode se realizó con alambre y manualmente como se ve en la figura.

3.- COLOCACIÓN DEL ÁLCALI

Dentro de estas cámaras se coloca el trípode y encima de él un vaso con 20 ml de NaOH 1M. Este NaOH, al igual que en el método anterior , va a ser la disolución que atrape el carbono desprendido por la atmósfera creada en el sistema, en este caso la que abarque las cámaras metálicas.

A todo el sistema explicado , se le vuelve a cubrir de papel de aluminio, que va a hacer que la temperatura que tenga el sistema no sea tan elevada. Estas cámaras con sus respectivas disoluciones se mantienen durante 24 horas.





Figuras 7-10. Colocación del recipiente con álcali sobre el trípode, situar encima las cubetas forradas, cubrir con papel de aluminio, rodear con una maya metálica

4.- CONTROLES

Los controles que tendremos para este método, se preparan de la misma manera. Cada una con su cámara, trípode y solución álcali, incubándose en el campo en las mismas condiciones.

5.- LABORATORIO

Una vez transcurrido el tiempo indicado, el NaOH 1M se traspasa a botes herméticos, para que no se vaya todo lo ocurrido en la incubación, y se lleva al laboratorio para una posterior valoración del mismo.

Para la valoración en el laboratorio de las disoluciones de NaOH, tanto las de los controles como las expuestas al aire del suelo, se les añade 5 gotas de fenolftaleína.

Si en el método anterior, la valoración a realizar fue con el pH-metro, en esta valoración se hará simplemente añadiendo fenolftaleína como indicador ácido – base y se valorará con HCl 1M. Utilizamos para esta valoración la bureta como la foto indica.

Durante la valoraciones irá removiendo la disolución para ver más claramente cuando es el punto de viraje.

6. CALCULOS

$$\text{C-CO}_2 \text{ desprendido} = \frac{(B-S) \times M \times 6}{A}$$

B = volumen medido (ml) de HCl empleado en la valoración de la disolución de NaOH

S = volumen (ml) de HCl empleado en la valoración de la disolución de NaOH problema

M = molaridad exacta de HCl utilizado en la valoración

6 = factor de conversión, considerando que 1 ml de NaOH 1M equivale a 6mg de C-CO₂

A = superficie (m²) abarcada por el cilindro metálico instalado en el campo

Nuestro cilindro metálico tenía un radio de 10 cm, por tanto su área es de 0.0314 m²:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD UREASA DEL SUELO POR EL MÉTODO DE TABATABAI Y BREMNER (1972) MODIFICADO POR NANNIPIERI et al., (1978)

El método está basado en la determinación del amonio liberado después de la incubación del suelo con una disolución de urea a 37°C durante 90 minutos. Este método fue propuesto primeramente por Tabatabai y Bremner (1972), sufriendo modificaciones por otros autores que afectan al tipo de tampón, presencia o no de tolueno, etc.

Materiales y aparatos

Balanza de precisión
Estufa de incubación
Utillaje de uso normal en el laboratorio.

Reactivos y disoluciones

- Disolución de urea al 6.4% (p:v). resulta conveniente preparar la disolución en el momento previo a la determinación , aunque se puede preparar y guardad en refrigeración por un corto periodo de tiempo.
- Tampón fosfato 0.1M pH 7.0. para su preparación es necesario partir del as siguientes disoluciones:
- Disolución de fosfato sódico monobásico 0.2M (disolución A) : se pesan 27.6g de fosfato sádico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y se lleva a un volumen de 1000ml con agua destilada
- Disolución de fosfato sódico dibásico 0.2m (disolución B). Se disuelven 53.65 g de $\text{Na}_3\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_3\text{O}$ en agua destilada y se lleva a 1000ml con agua destilada
- Finalmente para obtener el tampón fosfato a pH 7.0 se mezclan 26.5 ml de disolución A y 473.5 de disolución B y se llevan a 1000 ml con agua destilada.
- KCl 2M
- Reactivos para la determinación de amonio. Serán mencionados más adelante según sea por destilación o por electrodos selectivos.
- NaOH 10M

Procedimiento

La muestra a analizar se ha pasado previamente por un tamiz estéril de malla de 2mm. Se toman tres matraces erlenmeyers de 50ml por cada muestra, poniendo 2g de suelo fresco. Dos de esto matraces representan la muestra duplicada mientras que el tercero servirá de blanco.

Al blanco se le añaden 8ml de tampón fosfato 0.1M a pH 7.0 y 2ml de agua destilada, agitando bien a continuación; a cada uno de las otras dos muestras se le añaden 8ml de tampón fosfato 0.1M y 2ml de urea al 6.4%

Se deja que la muestra se empape bien con el líquido. Se tapan los matraces y se pone a incubar en un baño con agitación de vaivén a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se sacan los matraces del baño y a cada matraz se le añade 10 ml de CIK 2M. Se vuelven a tapar y se agitan durante 30 minutos en un agitador de vaivén.

A continuación se filtran sobre papel de filtro Whatman nº 40 (u otro tipo de papel de filtro que asegure que el filtrado no sea turbio) y el líquido filtrado se recoge en un matraz que también se tapa y posteriormente se analiza el amonio.

Medida del amonio liberado mediante electrodo selectivo

Materiales y aparatos

pH- metro
Electrodo selectivo de amonio
Agitador magnético.

Reactivos y disoluciones

CINH_4 10^{-2} M (solución estándar de amonio): disolver 0.2675 g de CINH_4 (seco en estufa a 60°C) en KCl 1M y enrasar a 500ml. Preparar cuando se vaya a utilizar o se puede congelar repartido en dosis y descongelar cada vez que haga falta. Preparar por dilución en KCl 1M una disolución 10^{-3} M . una vez preparado se puede conservar en nevera varios días .

Procedimiento

En la valoración potenciométrica del amonio se pueden utilizar dos procedimientos:

- Cuantificación a través de una curva de calibrado
- Cuantificación mediante adición de estándares.

Si se opta por la realización de una curva de calibrado, se puede aprovechar el tiempo de incubación de las muestras para realizar dicha curva, calibrando el potenciómetro con las soluciones estándares de CINH_4 10^{-2} y 10^{-3} M. Después de terminar el tiempo de incubación se añade KCl 2M tanto a muestras como el blanco y se agita. A continuación se filtra las muestras y los blancos con un papel apropiado . Las muestras y blancos permanecen tapados y se van destapando a medida que se van midiendo. Inmediatamente antes de medir se añade 0.1ml de NaOH 10M, se sumerge el electrodo en el líquido y durante el tiempo que dura la medida se tiene la muestra agitando en un agitador magnético. Los resultados de la medida directa por el proceso de adición de estándar se verifican por un cambio de voltaje en el electrodo antes y después de la adición, determinándose la concentración de la muestra original.

1.- TAMIZADO DE LA MUESTRA

Según el protocolo del método y al igual que en los casos anteriores, para la determinación de la actividad ureasa del suelo fue necesario tamizar las muestras a 2 mm

2.- UTILIZACIÓN DE ERLLENMEYERS

Una vez tamizado el suelo, se toman 3 erlenmeyers de 50 ml para cada muestra, y pusimos 2 g de suelo fresco (el que acabábamos de tamizar). De estos 3 matraces, dos van a ser la muestra duplicada, mientras que el tercero servirá como blanco.

- Blanco : A este matraz se le añade 8 ml de tampón fosfato 0.1M a pH 7 y 2 ml de agua
- Muestra : Mientras que a la muestra se le añade también 8 ml de tampón fosfato 0.1M a pH 7 y en vez de 2 ml de agua será 2 ml de urea al 6.4%



Después se deja que la muestra se empape bien con el líquido

Figura 12 : Erlenmeyers donde las muestras se están empapando bien con el reactivo

3.- INCUBACIÓN

Una vez realizado esto se tapan los matraces con parafilm y se pone a incubar en un baño con agitación de vaivén a 37°C durante 90 minutos.

La temperatura óptima de la actividad de caso todas las enzimas del suelo, estaría entorno a los 50°C, pero en la mayoría de los métodos se pone una temperatura de incubación de 37°C, como es nuestro caso. Las razones son : que es la temperatura que ocurren muchas de las reacciones biológicas y que es un temperatura suficiente para que la actividad pueda ser medida fácilmente y con una buena precisión.

El motivo por el que la incubación tiene que durar justamente 90 minutos es porque la reacción enzimática incrementa de manera lineal con el tiempo de incubación hasta un determinado momento en el que se pierde esa linealidad. Por tanto es necesario un tiempo lo suficientemente idóneo como para que la

liberación de los productos se produzca en una cantidad suficiente , para que se pueda realizar la posterior valoración. Pero este tiempo también tiene que se lo menos posible para que el sustrato (la urea) no se haga limitante.

También puede sorprender el caso de que la incubación, del método , sea con agitación de vaivén. Y es que , se ha comprobado que la medida era mayor que al realizarla en condiciones estáticas. Esto es debido a que las enzimas suelen ser absorbidas sobre la superficie del suelo (Skujins, 1967), la agitación incrementa la dispersión del suelo, por lo que mejora el contacto entre enzima y suelo.



Figura 13. La muestra incubándose en el baño de incubación con vaivén

4.- SEGUNDA INCUBACIÓN

Una vez transcurrido los 90 min de la incubación con agitación, se sacan los matraces y a cada matraz se le añade 10 ml de CIK 2M. Se vuelve a tapar y se le vuelve a aplicar una incubación con agitación a 37°C durante 30 minutos.

5.- FILTRACIÓN

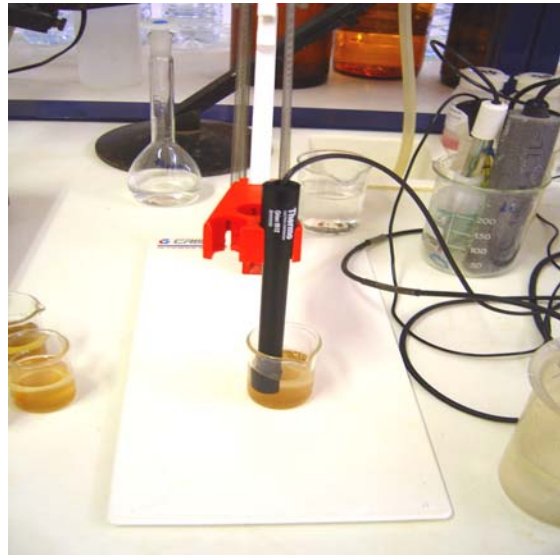
A continuación, se filtró sobre papel Whatman nº 40 aunque también podría haber sido cualquier otro papel de filtrado mientras que este asegurase un filtrado limpio. Se conectó un Erlenmeyer a un Venturi y se colocó un embudo encima en el cual se puso papel Whatman ; la filtración se hizo lentamente para que ninguna partícula estuviese en nuestro extracto filtrado.

A continuación se pasó el extracto a botes que se pudiesen cerrar herméticamente para que no hubiese problemas y se metió en el frigorífico a una temperatura de 4 °C

El tiempo que permaneció la muestra filtrada en el frigorífico fue de 3 días , es importante este dato ya que según científicos como (Skujins, 1967) la determinación se tiene que hacer con suelo fresco aquel que o bien se analiza inmediatamente o bien ha sido conservada a 4°C durante un máximo de 15 días

6. DETERMINACIÓN MEDIANTE ELECTRODO SELECTIVO DE AMONIO.

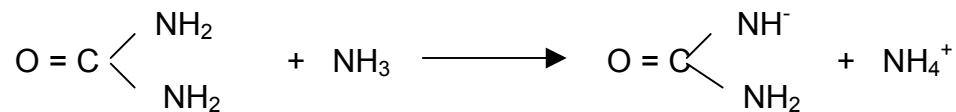
Una vez calibrado el electrodo , se miden nuestras muestras, que nada más antes de valorarlas se le añade 1 ml de NaOH 10M. Mientras el electrodo esta determinando su medida, la muestra se agita. Según el protocolo tendría que ser un agitador magnético, pero al ser nuestro extracto muy pequeño, no se creyó conveniente ya que lo que tarda el electrodo en dar su medida es muy breve. Por tanto, se agitó suavemente con la mano.



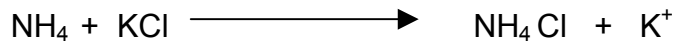
Figuras 14 y 15. Ppreparación del NaOH y valoración con el electrodo selectivo

Como se puede ver, la calibración se hace en concentración (ya que de otra manera no se puede hacer), la medida en milivoltios (porque es un análisis de potencia) y la fórmula qua nos presentan, es en concentración (ya que lo que queremos medir es $\mu\text{moles de N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$)

El proceso químico resumido es el siguiente

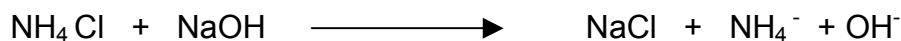


A muestra que tiene amonio, se le añade urea y se convierte en amonio (NH_4)



Al amonio se le añade KCl para estabilizarlo como cloruro de amonio.

Pero lo que queremos medir con el electrodo es el ion NH_4^+ , por ello justo antes de valorarlo se le añade NaOH 10 M.



7. CÁLCULOS

$$AE = \frac{(S - B) \times V}{G \times T}$$

S = concentración en N.-NH₄⁺ ml⁻¹ del extracto correspondiente a la muestra de suelo.

B = concentración en N.-NH₄⁺ ml⁻¹ del extracto correspondiente a los blancos.

V = volumen del extracto utilizado en la incubación del suelo (20ml)

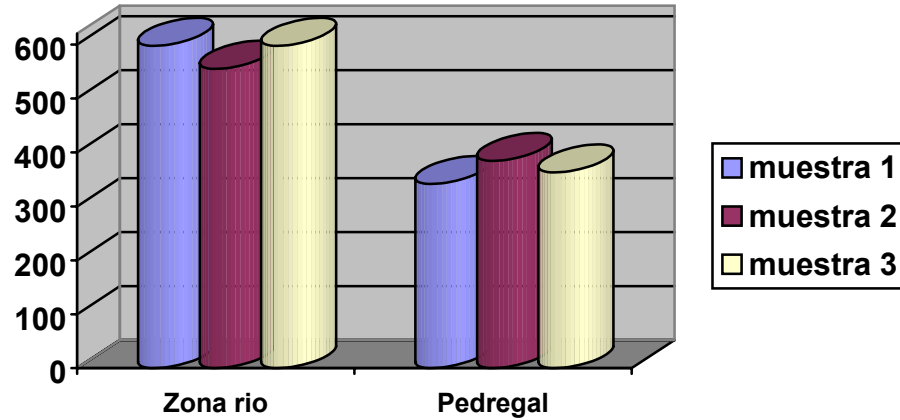
G = factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizadas en el ensayo (en este caso, suelo seco en 2 g de suelo húmedo)

T = factor relativo al tiempo de incubación en horas (en este caso, 1.5 horas)

5. RESULTADOS

Método de fumigación-incubación

g C-biomasa de la zona río



	Zona río	Pedregal
muestra 1	597,33	341,3
muestra 2	554,67	384
muestra 3	597,33	362,67

Cociente de las medias de los dos ambientes: 0.62

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL MÉTODO FUMIGACIÓN- INCUBACIÓN DE JENKINSON Y POWLSON (1976)

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

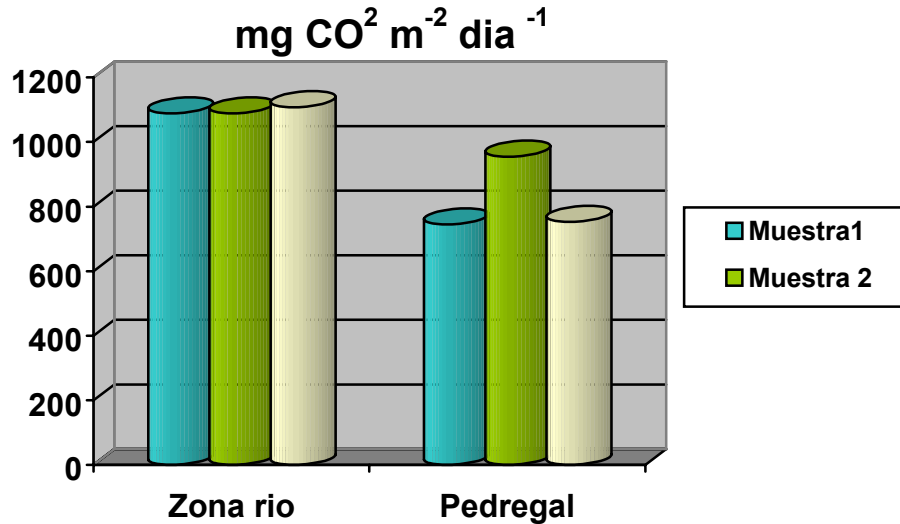
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	1749,33	583,11	606,6252
Columna 2	3	1087,97	362,6566667	455,8226

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	72899,50827	1	72899,50827	137,2293	0,0003037	7,708647421
Dentro de los grupos	2124,895667	4	531,2239167			
Total	75024,40393	5				

Realizado el análisis de la varianza, la probabilidad de hipótesis nula es de 0.0003. Un valor tan bajo es expresivo de la alta definición del método, así como de su repetibilidad y fiabilidad

Método de incubación estática



	Zona rio	Pedregal
Muestra 1	1089	745
Muestra 2	1089	955
Muestra 3	1108	753

Cociente entre las medias de los dos ambientes: 0.74. Si eliminamos la muestra 2 en pedregal: 0.68

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL MÉTODO DE ABSORCIÓN ESTÁTICA ANDERSON 1982

ALEF 1995

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	3286,62	1095,54	121,7307
Columna 2	3	2484,07	828,0233333	12535,71

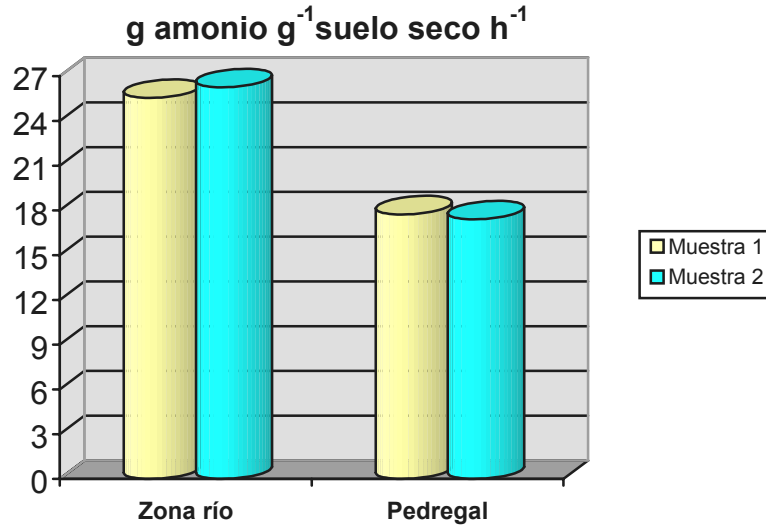
ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	107347,7504	1	107347,7504	16,96199	0,0146304	7,708647421
Dentro de los grupos	25314,88987	4	6328,722467			

Realizado el análisis de la varianza, la probabilidad de hipótesis nula es de 0.014. Las diferencias son significativas, pero el valor de la muestra 2 en "pedregal" impiden un resultado tan espectacular como el del método de fumigación-incubación.

Así pues, este método ofrece una repetibilidad y fiabilidad algo menores que el anterior

Método de la actividad ureasa



	Zona río	Pedregal
Muestra 1	25,53	17,73
Muestra 2	26,25	17,4

Cociente entre las medias de los dos ambientes: 0.67

**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL MÉTODO DE LA ACTIVIDAD UREASA
DEL SUELO POR TABATABAI Y BREMNER (1972) MODIFICADO POR NANNIPIERI (1978)**

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	2	51,78	25,89	0,2592
Columna 2	2	35,13	17,565	0,05445

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	69,305625	1	69,305625	441,9297	0,002255152	18,51282051
Dentro de los grupos	0,31365	2	0,156825			
Total	69,619275	3				

Realizado el análisis de la varianza, la probabilidad de hipótesis nula es de 0.002, muy inferior al 1% por lo que la significatividad de las diferencias es también muy alta, y por tanto la repetibilidad y fiabilidad del método

6. CONCLUSIONES

1. El método de fumigación-incubación presenta la más alta repetibilidad, seguido del de la ureasa. El método de la absorción estática aparece como el más errático.
2. Los métodos presentan una sensibilidad muy parecida por lo que parecen intercambiables. Esto se pone de manifiesto por la obtención de los cocientes entre los valores de "pedregal" y "rio", que en los tres métodos presentan valores comparables, pero especialmente entre los métodos de absorción estática y actividad ureasa
3. Dado que el método que presenta mayor repetibilidad es precisamente el que se aleja algo más en el cociente de las medias, parece recomendable, al menos durante la primera campaña, llevar a cabo los tres métodos.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEF K, 1995. Soil Respiration. Methods in applied soil. Microbiology and Biochemistry. Academic Press
- ANDERSON, J.P.E., 1982. Soil respiration. Methods of soil analysis. Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy/soil science Society of America
- ATLAS , R.M. AND BARTHA R.1987 " Microbial ecology : Fundamentals and Applications"
- C.E.MILLAR, L.M.TURK; H.D.FOTH 1981 "Fundamentos de la ciencia del suelo" Ed. Continental
- CARLOS GARCÍA, FERNANDO GIL, TERESA HERNÁNDEZ, CARMEN TRASAR 2003 " Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos" Ed. Mundi-Prensa.
- DOETSCH, R.N. Y T.M. COOK, 1973. Introduction to bacteria and their ecobiology . University Park Press.
- EUGENIO COBERTERA, 1993. Edafología aplicada. Ed. Catedra
- G. GAUCHER 1971 "El suelo y sus características agronómicas" Ed. Omega
- GILBERT W., ROBINSON 1967 " Los suelos" Ed Omega
- GUITIAN OJEDA, CARBALLAS FERNÁNDEZ 1975 "Técnicas de análisis de suelos" Ed. Picosacro
- J. PORTA, M. LÓPEZ-ACEVEDO, C. ROQUERO 1999 "Edafología para la agricultura y el medio ambiente" Ed. Mundi Prensa
- JACQUES DUCHÉ 1950 " La biologie des sols" Ed Presses univesitaires de France
- MAIDER , M. M. , PEPPER, I.L. AND GERBA, C.P. 2000 " Enviromental microbiology" . Academic Press
- MARK COYNE, 2000. Microbiología del suelo : Un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo
- MICHAEL T. MADIGAN , JOHN M MARTINKO , JACK PARKER 1997 " Biología de los microorganismos " 10º edición. Prentice
- NANNIPIERI P. , JOHNSON R.L., POOL E.A, 1978. Criteria of measurement of microbial growth and activity in soil. Soil Biology and Biochemistry.
- P. M. HUANG Y M. SCHNITZER, 1986. Interactions of soil Minerals with natural organic and microorganisms. Soil Science Society of America.

POWLSON, D.S. , JENKINSON D.S., 1996. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. Soil Biology and Biochemistry.

PRESCOTT , HARLEY AND KLEIN “ Microbiología “ McGraw Hill – Interamericana. 5º edición.

STEVENSON, F.J. , 1982. Nitrogen in Agricultural soils.

TABATABAI, M.A., BREMNER, J.M. , 1972. Assay of urease activity in soil. Soil Biology and Biochemistry.

Páginas Web :

www.sciencedirect.com

www.labor-balzer.de/lbz/sp/infospan.htm

www.aragricolas.org/extras/doccgn.as

www.im.microbios.org

Mucha de la información utilizada para la redacción de este estudio fue facilitada por los siguientes profesores a los que les agradecemos su interés y colaboración:

Henar Valdivieso Montero del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

Francisco Bermúdez de Castro profesor de la Universidad Complutense de Madrid y titular del Departamento de Ecología

Fernando Leal profesor titular de Microbiología de la Universidad de Salamanca.

Miguel Álvarez del CSIC de Madrid.