



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

*CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
UNAM, CAMPUS MORELIA*

DINÁMICA ENZIMÁTICA ESTACIONAL ASOCIADA A CARBONO,
NITRÓGENO Y FÓSFORO DEL SUELO EN UN ECOSISTEMA
TROPICAL SECO TRANSFORMADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA
ANA LIDIA SANDOVAL PÉREZ

ASESORES:
Dra. Mayra E. Gavito Pardo (UNAM)
Dr. Mauro M. Martínez Pacheco (UMSNH)

Í N D I C E

	Página
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	4
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo General.....	12
3.2 Objetivos particulares.	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 Descripción del área de estudio.....	14
5.2 Diseño experimental y muestreo de suelo.....	18
5.3 Métodos analíticos: Análisis de laboratorio.....	20
5.3.1. Determinación de porcentaje de humedad y pH	20
5.3.2. Determinación de C, N y P total del suelo.....	20
5.3.3. Determinación de nutrientes disponibles del suelo.....	20
5.3.4. Determinaciones enzimáticas.....	21
5.3.4.1. Determinación de la actividad de deshidrogenada del	
suelo.....	21
5.3.4.2. Determinación de la actividad de ureasa del suelo.....	22
5.3.4.3. Determinación de la actividad de fosfatasa del suelo	22
5.4. Análisis estadístico.....	23
6. RESULTADOS.....	24

6.1 pH y humedad del suelo.....	25
6.2. Carbono (Total, C lábil y deshidrogenasa).....	26
6.3. Nitrógeno (Total, formas disponibles (NH_4^+ y NO_3^-) y ureasa).....	28
6.4. Fósforo (Fósforo total, ortofosfatos y fosfatasa).....	31
7. DISCUSIÓN.....	34
8. CONCLUSIÓN.....	42
9. BIBLIOGRAFÍA.....	43
10. ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación geográfica del sitio de estudio	15
Figura 2. Precipitación pluvial mensual del año 2005 en Chamela, Jalisco, México. Las flechas oscuras indican los meses que se realizaron los muestreos.....	18
Figura 3. Variación estacional de la actividad enzimática de la deshidrogenasa del suelo con tres tipos de uso de suelo bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	27
Figura 4. Variación estacional de las concentraciones de las formas disponibles de nitrógeno (a) NH_4^+ y (b) NO_3^- en el suelo con tres tipos de uso de suelo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	28
Figura 5. Variación estacional del cociente nitrato:amonio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) del suelo con tres tipos de uso de suelo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.	29
Figura 6. Variación estacional de la actividad enzimática de la ureasa del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	29
Figura 7. Variación estacional del ortofosfato (forma disponible de fósforo) del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	30
Figura 8. Variación estacional del cocientes ortofosfato: fósforo total ($\text{PO}_4^-:\text{P}_t$) del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P). en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	31
Figura 9. Variación estacional de la actividad enzimática de la fosfatasa del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.....	31
Cuadro 1. Fechas que se realiza la toma de muestras de suelo.....	18
Cuadro 2. Descripción y antecedentes de manejo de los sitios de estudio.....	

	19
Cuadro 3. Valores de F y sus niveles de significancia con un ANOVA con medidas repetidas para las variables del suelo de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) de dos fechas en la Región de Chamela, México.....	24
Cuadro 4. Valores de F y sus niveles de significancia con un ANOVA con medidas repetidas para las variables del suelo de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) de cuatro fechas en la Región de Chamela, México. ...	25
Cuadro 5. pH y humedad del suelo con tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) en cuatro fechas.....	26
Cuadro 6. Carbono, nitrógeno, y fósforo total, carbono lábil y sus coeficientes (C:N y C:P) de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) en dos fechas.....	27

ÍNDICE DE FOTOS Y ANEXOS

	Página
Foto 1. Bosque primario. A la izquierda la rep. BP1 (Tejón) y a la derecha la rep. BP2 (Búho).	17
Foto 2. Bosque secundario. A la izquierda la rep. BS1 (Guayabiloso) y a la derecha la rep. BS2 (La Abuela).	17
Foto 3. Potrero. A la izquierda la rep. P1 (Estanque) y a la derecha la rep. P2 (Cerrito).	17
.....	
Anexo 1. Actividad de la deshidrogenasa en el suelo.	53
Anexo 2. Actividad de la ureasa en el suelo	54
Anexo 3. Actividad de la fosfatasa en el suelo	56

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial los bosques tropicales secos están sometidos a un continuo y drástico proceso de transformación asociado a las actividades humanas (Miles et al., 2006). Los bosques tropicales secos en Latinoamérica presentan la mayor tasa de deforestación (Janzen, 1988). En México este ecosistema tropical tiene una tasa anual de deforestación de 1.4% (Trejo y Dirzo, 2000), la cual ha reducido la cobertura a un 7% que antes ocupaba el 14% del territorio nacional (Palacio-Prieto et al., 2000). Entre las principales consecuencias de la perturbación de la vegetación y del cambio de uso de suelo está la degradación del suelo. Esto ocurre debido principalmente a una modificación en las condiciones microclimáticas que provoca la alteración en la humedad y la reducción en los aportes y la calidad de la materia orgánica del suelo.

La transformación ocasiona pérdidas severas de nutrientes como resultado de la erosión del suelo (Maass 1995; García-Oliva et al., 1994; García-Oliva y Maass 1998; García-Oliva et al., 2006) y de la disminución de los mecanismos de protección de nutrientes como la cantidad de raíces finas, de agregados y de la actividad microbiana del suelo (Singh et al., 1991; Prasad et al., 1994; García-Oliva et al., 1999a; Castellanos et al., 2001). Generalmente, después de la transformación del bosque, los suelos son cultivados por 2 o 3 años con maíz y posteriormente se introducen pastos para uso ganadero (praderas). Sin embargo, las praderas son frecuentemente abandonadas después de varios años de uso, permitiendo una aparente recuperación de la vegetación del bosque y desarrollando el bosque secundario, el cual a largo plazo podría favorecer la recuperación del bosque primario original. Sin embargo, en la región de Chamela, aún después de 40 años desde que ocurrió la apertura y el abandono de parcelas, los bosques secundarios generados son muy diferentes del bosque primario (Burgos y Maass 2004). Ante esta situación es difícil predecir la regeneración del bosque primario y cuánto tiempo requerirá, o si se establecerá un

ecosistema diferente. Además, son pocos los estudios que documentan si el ciclaje de nutrientes se recupera cuando se establece el bosque secundario (Saynes et al., 2005); y el tiempo de recuperación de la fertilidad dependiendo del tipo de uso del suelo, por lo que es necesario conocer cómo es la dinámica de recuperación de nutrientes después de que el bosque secundario se establece.

La mayoría de los estudios sobre nutrientes se han realizado en bosques primarios y praderas con menos de 26 años de uso. Estos estudios documentan que la actividad biológica y el ciclaje de nutrientes del suelo son modulados por la estacionalidad de la lluvia (Jaramillo y Sanford, 1995; Roy y Singh, 1995). Ellos observaron que en los bosques primarios y praderas ocurre una liberación de nutrientes al inicio de las lluvias, mientras que a lo largo del periodo de lluvias, la lixiviación y la toma de nutrientes por la vegetación disminuyen la disponibilidad de éstos. En contraste, en la estación seca, se acumula carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) en el suelo y en la biomasa microbiana (Singh et al., 1989; Jaramillo y Sanford 1995). Sin embargo, la relación entre la lluvia, la biomasa microbiana, la disponibilidad de nutrientes y en particular la actividad enzimática han sido poco estudiadas en los bosques secundarios tropicales (Saynes et al., 2005). Entender la relación entre estas variables del suelo ayudaría a predecir si en los bosques secundarios se han recuperado algunos de los procesos biogeoquímicos en comparación con el bosque primario original. Al respecto, es de particular interés la dinámica de C, N y P, debido a que estos nutrientes están ligados al mantenimiento de la productividad de los ecosistemas terrestres y son los principales en la nutrición de las plantas y microorganismos (Chapin et al., 2002).

La transformación de los bosques provoca cambios en las propiedades físicas, biológicas y bioquímicas del suelo, con impacto negativo en las poblaciones microbianas y por lo tanto, afectando la actividad enzimática y la disponibilidad de nutrientes del suelo

(García-Oliva et al. 1999b). Los microorganismos secretan enzimas extracelulares tales como las ureasas y fosfatasas. En el suelo la actividad enzimática es dependiente de varios factores entre los que se encuentran principalmente: pH, humedad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y la cantidad de sustrato (Sinsabaugh, 1994). Estos factores también influyen en la actividad microbiana del suelo ejerciendo control sobre la producción y actividad enzimática y modificando a su vez la disponibilidad de nutrientes y la fertilidad del suelo (McGill y Cole 1981; Sinsabaugh et al., 1993). Por ejemplo, cuando la disponibilidad de nutrientes es baja la actividad enzimática aumenta (McGill y Cole 1981), si bien la producción microbiana de las enzimas depende de que los microbios tengan suficiente energía (fuentes de carbono y nitrógeno) para producirlas (Olander y Vitousek 2000).

La actividad enzimática puede ser utilizada como un indicador de la degradación del suelo, del metabolismo microbiano y de la fertilidad del suelo (Wick et al., 1998; Aon y Colaneri 2001; Baum et al., 2003; Chen et al., 2003). Por ejemplo, la deshidrogenasa es una enzima exclusivamente intracelular asociada a células microbianas viables que es considerada un estimador de la actividad microbiana (García et al., 1994). Asimismo, enzimas como la ureasa y la fosfatasa están involucradas en la mineralización de formas orgánicas de N y P, respectivamente, y son esenciales para el mantenimiento de las formas inorgánicas de estos nutrientes del suelo (Chapin et al., 2002). En sistemas distintos a los tropicales se ha documentado que el cambio en el uso de suelo disminuye la actividad enzimática del suelo (Qilchano y Marañón, 2000; Bandick y Dick, 1999).

El objetivo general de este trabajo fue (1) determinar el efecto del uso del suelo sobre los almacenes de C, N y P, la variabilidad estacional de la dinámica de estos nutrientes y la actividad de tres enzimas relacionadas a ellos: la deshidrogenasa, relacionada con la actividad microbiana y la degradación de materia orgánica (C), y la ureasa y la fosfatasa involucradas en la mineralización del N y P, respectivamente y (2)

explorar las relaciones entre estas variables para evaluar el estado de los procesos biogeoquímicos del suelo en tres tipos de uso de suelo del ecosistema tropical seco y seleccionar las variables que pueden ser mejores indicadoras de degradación/recuperación de procesos a largo plazo.

2. ANTECEDENTES

El suelo y sus propiedades son el resultado de la interacción de diversos factores como el clima, el relieve, la edad, los organismos vivos, el material parental y la actividad humana, los cuales interactúan a través del tiempo y son determinantes en el proceso de formación del suelo y de sus características químicas y físicas. El suelo es un componente muy importante de la dinámica de los ecosistemas, ya que puede afectar la disponibilidad de agua y nutrientes, que a su vez determinan la productividad primaria (Alexander, 1994). El suelo se considera como un sistema complejo formado por cinco componentes principales: material mineral, agua, aire, materia orgánica y microorganismos. Los microorganismos juegan un papel importante ya que participan en una serie de procesos que permite el mantenimiento de la fertilidad del suelo a largo plazo (Alexander, 1994; Brady y Weil 2002). El suelo contiene cinco grupos importantes de microorganismos que son bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios (Paul y Clark 1989). Los microorganismos regulan una variedad de procesos que se desarrollan en el suelo, como la descomposición de la materia orgánica, la inmovilización y mineralización de nutrientes y la actividad enzimática, que mantienen la fertilidad del suelo (Srivastava y Singh 1988; Paul y Clark 1989).

Las enzimas son importantes catalizadores proteicos responsables de la disponibilidad de los nutrientes orgánicos e inorgánicos. Ellas disminuyen la energía de activación de las reacciones bioquímicas y permiten que la transformación química se produzca a temperaturas y presiones a las que normalmente no tendrían lugar. Una parte importante de las enzimas del suelo son, sin duda, las enzimas extracelulares que son liberadas durante el ciclo de vida del microorganismo, No obstante, otras enzimas son intracelulares y forman parte de la biomasa microbiana y son liberadas cuando el microorganismo muere (Paul y Clark, 1989).

Paul y Clark (1989) indicaron que las actividades enzimáticas son específicas de un sustrato y están relacionadas con reacciones específicas. Por ello es difícil inferir mediante un solo valor de actividad enzimática el estado general de nutrientes de un suelo o determinar la actividad microbiológica del mismo. Sin embargo, las mediciones simultáneas de varias enzimas sí pueden resultar útiles como marcadores de bioactividad y pueden utilizarse como índices bioquímicos de fertilidad de los suelos (Tabatabai 1994). De las enzimas más determinadas como índice de fertilidad de suelos, están las hidrolasas, y otros grupos entre las que se pueden citar a las oxidoreductasas, liasas y transferasas. Muchas de ellas están relacionadas a los ciclos del carbono (celulasas, β -glucosidasa), del nitrógeno (ureasa y proteasa) y del fósforo (fosfatasa). La actividad enzimática ha sido utilizadas como: indicador de la productividad, medida indirecta de la biomasa microbiana, comparación de efectos de la rizósfera, índice potencial del suelo para descomponer distintos materiales orgánicos, e indicadores de posible contaminación con metales pesados o pesticidas (Burns 1982; Dick 1992; Dick y Tabatabai 1993).

La actividad enzimática del suelo depende de la composición de las comunidades microbianas (Alexander 1994). El patrón de eventos de lluvia crea ciclos de secado y humedecimiento del suelo que modifican el tamaño de las poblaciones microbianas y

promueven la liberación de nutrientes microbianos disponibles para la planta y para los microorganismos sobrevivientes. Los microorganismos funcionan como almacén y fuente de nutrientes que se acumulan en forma biológicamente activa en la estación seca, reduciendo así la pérdida de nutrientes del suelo, mientras que durante la estación de lluvia los nutrientes se liberan rápidamente y quedan disponibles para la vegetación (Singh et al., 1989). Los microorganismos tienen la capacidad de utilizar moléculas orgánicas, de mineralizarlas a compuestos inorgánicos y de oxidar o reducir los compuestos inorgánicos como en el nitrógeno o el fósforo (Alexander 1994).

Importancia del carbono

El carbono es un elemento básico en la formación de las moléculas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, pues todas estas moléculas están formadas por cadenas de carbonos enlazados entre sí. El carbono en forma de dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera es fijado por las plantas durante el proceso de la fotosíntesis. Por medio de la fotosíntesis el CO_2 es transformado en C orgánico. Los consumidores se alimentan de las plantas y así el carbono pasa a formar parte de ellos, en forma de proteínas, grasas, hidratos de carbono, etc. En el proceso de la respiración aeróbica, se utiliza la glucosa como combustible y es degradada liberando el carbono en forma de CO_2 a la atmósfera. Por lo tanto en cada nivel trófico de la cadena alimentaria, el carbono regresa a la atmósfera como resultado de la respiración (Chapin et al., 2002). Los desechos del metabolismo de las plantas y animales, así como los restos de organismos muertos, se descomponen en los elementos primarios por la acción enzimática de ciertos hongos y bacterias, los cuales liberan exoenzimas específicas para hidrolizar los sustratos que están el suelo. Durante el

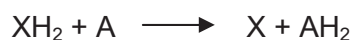
proceso de descomposición también se libera CO₂. Algunas fuentes de energía para los microorganismos heterótrofos son: celulosa, hemicelulosas, ligninas, almidón, hidrocarburos, azúcares, proteínas, aminoácidos y ácidos orgánicos. Para que estos compuestos puedan utilizarse deben ser asimilados por los microbios, pero algunas células microbianas son impermeables a moléculas complejas, de manera que el organismo debe excretar enzimas extracelulares para hacer aprovechable el suministro de carbono. El catalizador extracelular actúa hidrolíticamente, convirtiendo el material insoluble en azúcares solubles que penetran la membrana (Chapin et al., 2002). Por ejemplo, una vez dentro de la célula, los azúcares simples son oxidados y proveen la energía para las reacciones biosintéticas (Paul y Clark, 1989; Alexander 1994).

Los microorganismos producen enzimas que hidrolizan fuentes de carbono como por ejemplo: celulosa (sistema enzimático celulolítico), hemicelulosas (en un conjunto de endoenzimas que hidroliza el polímero y exoenzimas que lo llevan a dímeros y monómeros), manosa (manonadas, enzimas extracelulares de hongos y bacterias), amilasa (hidroliza almidón) y pectinesterasa que hidroliza sustancias pécticas; (Alexander 1994). Esto permite mantener las reservas de C disponible y por lo tanto, la biomasa y actividad microbiana (Chapin et al., 2002).

La cantidad, el tipo y la disponibilidad de la materia orgánica, determina el tamaño y composición de las comunidades microbianas del suelo. Sin embargo, la materia orgánica incluyendo el carbono y los nutrientes, se pierden del suelo por la deforestación, combustión, lixiviación y erosión, una vez que la vegetación ha sido removida. Entre las consecuencias de la conversión de los bosques tropicales están: la reducción de especies vegetales, la reducción de la cobertura, la modificación del ciclo de agua y los cambios en el estado de los nutrientes del suelo (Maass 1995). La interacción de estos factores podría modificar la

biomasa de las comunidades microbianas. Por esto es importante tener un estimador de la actividad microbiana que este asociada a la degradación inicial de la materia orgánica y que de una medida de la actividad metabólica del suelo al incorporar fracciones orgánicas lábiles.

La actividad de la deshidrogenasa solo se encuentra en células viables, se produce de manera intracelular, está asociada a procesos respiratorios de los microorganismos y es dependiente del estado metabólico y de la actividad biológica. La actividad total de la deshidrogenasa en el suelo refleja las reacciones oxidativas globales de la microflora edáfica y, consecuentemente se le considera un buen indicador de la actividad microbiológica (Skujins, 1973; Tabatabai 1994). El proceso de deshidrogenación se puede representar de la siguiente forma:



Donde XH_2 es el compuesto orgánico (donador de hidrogeno) y A es el aceptor de hidrogeno. La medida de la actividad de la deshidrogenasa muestra la oxidación de la materia orgánica del suelo y la transferencia de H por los sustratos aceptores.

Este tipo de reacciones supone la existencia de un aceptor de electrones que en este caso, es una sal de tetrazolio (INT, cloruro de iodonitrotetrazolio) la cual se reduce a la correspondiente sal de formazán coloreada e insoluble en agua, que después se extraerá con un disolvente orgánico (p. ej. metanol). La medida colorimétrica de la cantidad de sustrato transformado en iodonitrotetrazolformazán, cuantificará la actividad deshidrogenasa. Por lo tanto, el resultado del análisis de la actividad de deshidrogenasa es una medida de la actividad de la población activa (Skujins, 1973; Tabatabai 1994). Sin embargo, la actividad de la deshidrogenasa en el suelo esta expuesta a factores que inhiben su acción, como la adsorción al complejo organomineral, las variaciones del pH, el contenido y el tipo de materia orgánica, la textura, e incluso factores como la fertilización y las labores de cultivo (Sarkar et. al., 1989).

Importancia del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento estructural de las moléculas de proteínas, y un componente indispensable del protoplasma de plantas, animales y microorganismos (Alexander 1994). Los seres vivos requieren átomos de nitrógeno para la síntesis de moléculas orgánicas esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos, por lo tanto es un elemento indispensable para su desarrollo. El ciclo del nitrógeno inicia con los organismos fijadores de nitrógeno, que producen NH_3^+ , aminoácidos y otras moléculas nitrogenadas. Finalmente pasa a las plantas y animales, donde se encuentra formando parte de las proteínas, aminoácidos, glucosamina, ácidos nucleicos, etc. El nitrógeno excedente retorna al suelo en forma de urea, ácido úrico ó como desechos de plantas y animales. El nitrógeno orgánico es liberado como amonio y posteriormente es oxidado a nitrato o nitritos, a través del metabolismo microbiano que mineraliza los complejos orgánicos del suelo (proteínas, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc.) hasta iones inorgánicos como el amonio (amonificación) y nitratos (nitrificación). El exceso de amonio es un producto de desecho del metabolismo microbiano, y representa la cantidad de nitrógeno que sobrepasa a la demanda microbiana (Chapin et al., 2002; Schimel y Bennett, 2004).

Otra actividad enzimática importante en el reciclaje de nitrógeno es la enzima ureasa que cataliza la reacción de hidrólisis de la urea a amonio. Esta enzima se encuentra presente en las plantas superiores y en los microorganismos (particularmente las bacterias). En las comunidades microbianas la ureasa puede ser constitutiva e inducible (Alexander 1994). Bajo el nombre común de ureasas se conoce a numerosas amidohidrolasas e hidrolasas que actúan sobre enlaces C-N (no peptídicos) de amidas lineales. La reacción catalizada por esta enzima puede ser representada por la siguiente reacción, donde el carbonato de amonio es un intermediario de la hidrólisis:



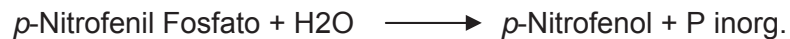
Las bacterias, hongos y actinomicetos sintetizan ureasa y pueden usar la urea como fuente de nitrógeno para su crecimiento. En el suelo la tasa de hidrólisis de la urea, varía con la vegetación y con la presencia de raíces de plantas y disminuye con la profundidad. Un nivel adecuado de C disponible permite a las poblaciones microbianas producir las exoenzimas ureolíticas que degradan a las moléculas más complejas, manteniendo disponibles las reservas de C y N disponibles. Ésta enzima existe fuera de la célula y es probable que sea adsorbida por las arcillas y coloides orgánicos, estabilizándola de esta manera. Sin embargo, la humedad, la disponibilidad de O₂ y el pH del medio afectan la actividad enzimática.

Importancia del fósforo

El fósforo se encuentra en el suelo, en los seres vivos, y en cierto número de compuestos orgánicos y inorgánicos; es esencial en la nutrición de las plantas y los microorganismos, pero sólo puede ser asimilado por estos como P inorgánico (P_i) (Chapin et al., 2002). La proporción de fósforo en la materia viva es relativamente pequeña, pero el papel que desempeña es vital. El fósforo orgánico puede ser la fracción más importante que controla la disponibilidad del fósforo en algunos suelos (McGill y Cole, 1981). El fósforo orgánico es mineralizado fuera de las membranas celulares de los microorganismos del suelo, como resultado de la producción de la fosfatasa, la cual es una exoenzima que también es producida por hongos y plantas y que hidroliza enlaces diéster y libera el P_i favoreciendo la disponibilidad de P en el suelo (Paul y Clark, 1989).

La disponibilidad del fósforo del suelo depende en gran parte de la mineralización de las diferentes fracciones orgánicas, por lo que las enzimas fosfatasas tienen un papel importante en las reacciones de dicho proceso. Las fosfatasas son enzimas inducibles y la

intensidad de su excreción por las raíces de las plantas y los microorganismos, está determinada por sus requerimientos de fosfatos. La determinación de la actividad de la fosfatasa en los suelos se realiza con sustratos artificiales de hidrólisis rápida como el *p*-nitrofenil fosfatodisódico (*p*-NPP), el cual se hidroliza a *p*-nitrofenol (*p*-NP) desarrollando un color amarillo en medio básico susceptible a la determinación colorimétrica (Tabatabai, 1994), tal como se describe en la siguiente reacción:



Las fosfatasas poseen dos intervalos óptimos de pH para realizar su actividad catalítica y habitualmente se refieren a fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas. Tabatabai (1994) indica que la fosfatasa ácida es producida tanto por bacterias, hongos y actinomicetos, como por las raíces de las plantas. Sin embargo, éstas últimas no producen fosfatasas alcalinas, que son totalmente de origen microbiano. Las fosfatasas son inhibidas por el producto final de su reacción enzimática, el fósforo inorgánico, ya que presenta una retroinhibición y sólo se producirá la activación de la fosfatasa si existe deficiencia de fósforo disponible (Paul y Clark, 1989; Olander y Vitousek 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

1. Evaluar el efecto del uso del suelo en el ecosistema tropical seco sobre las formas totales y disponibles de C, N y P, así como la actividad enzimática de la deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa, las cuales están relacionadas con la mineralización de estos nutrientes.
2. Evaluar algunos parámetros del suelo como indicadores de la recuperación/degradación de los procesos biogeoquímicos (a largo plazo) en sitios con diferente uso prolongado de suelo en el ecosistema tropical seco.

3.2. Objetivos particulares

1. Cuantificar la variación estacional de las formas totales y disponibles de C, N, P del suelo de bosque tropical seco primario, bosque secundario y potrero de más de 25 años de uso.
2. Cuantificar la variación estacional de la actividad enzimática de la deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa del suelo en bosque tropical seco primario, bosque secundario y potrero de más de 25 años de uso.
3. Determinar el efecto del uso del suelo sobre la relación entre la actividad enzimática y la disponibilidad de nutrientes y comparar las dinámicas estacionales actuales establecidas en el bosque tropical seco primario, bosque secundario y potrero de más de 25 años de uso.

4. Explorar las posibles relaciones y agrupaciones entre las variables determinadas para seleccionar aquellas que se asocien más al tipo de uso de suelo, y tengan mayor potencial como indicadores de procesos biogeoquímicos.

4. HIPÓTESIS

1. Se espera que los nutrientes disponibles sean mayores en la estación seca cuando hay acumulación y disminuyan durante la estación de crecimiento cuando es mayor la actividad de plantas y microorganismos.
2. La actividad enzimática será mayor en la estación de lluvias cuando hay demanda de nutrientes.
3. La actividad enzimática disminuirá en los sitios perturbados con respecto al bosque primario, debido a que se reducen los niveles de carbono (energía disponible) y la disponibilidad de nutrientes para la actividad microbiana del suelo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Descripción del área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la Región de Chamela localizada en el estado de Jalisco, México (19° 29' N, 105° 01' W). La temperatura anual es de 24.9° C y la precipitación anual promedio es de 746 mm, concentrándose el 80 % entre junio y octubre y presentando un fuerte patrón estacional (García-Oliva et al., 2002). La vegetación dominante es un bosque tropical caducifolio altamente diverso, donde la mayoría de las especies arbóreas pierden sus hojas al finalizar la estación de lluvias (Lott 1985; Bullock y Solís-Magallanes, 1990). La flora de la Región de Chamela comprende cerca de 1120 especies de plantas vasculares, pertenecientes a 554 géneros y 124 familias. Las familias de plantas con mayor número de especies son las Leguminosae, Euphorbiaceae, Rubiaceae y Bignoniaceae y más del 10 % de las especies son endémicas de los estados de Jalisco y Colima, México (Lott 1985). El paisaje se caracteriza por ser de lomeríos bajos con laderas de pendientes marcadas (< 20° de pendiente) que representan el 80 % del área del paisaje (Galicia, 1992). Los suelos son clasificados en el sistema FAO (Food and Agriculture Organization) como Regosoles éutricos, con una textura migajón-arcillo-arenosa que se desarrollan sobre riolitas del Terciario (Cotler et al., 2002). El suelo tiene un pH promedio de 6.8 y concentra el 30 % de la materia orgánica y el 70 % de las raíces finas en los primeros cinco centímetros de profundidad (García-Oliva y Maass 1998; Castellanos et al., 2001). En la Región, el bosque tropical caducifolio primario es comúnmente transformado por roza-tumba-quema a pasturas que posteriormente son abandonadas permitiendo el desarrollo de bosques secundarios (Gutiérrez-Alcalá, 1993). Las parcelas de los sitios manejados han sido intensamente perturbadas, con fuego y pastoreo, presentando una elevada erosión y un

reducido contenido de materia orgánica en el suelo como se ha reportado para otros sitios (García-Oliva et al., 1994; García-Oliva y Maass, 1998).



Figura1 Ubicación geográfica del sitio de estudio

En este estudio se seleccionaron tres tipos de uso de suelo: bosques primarios en buen estado de conservación, potreros de largo tiempo de uso ganadero y bosques secundarios de largo tiempo de regeneración. Dada la dificultad para encontrar sitios con exactamente las mismas condiciones edáficas, topográficas, de vegetación y de tipo de manejo, únicamente se pudieron encontrar dos sitios de cada tipo que se podían considerar repeticiones verdaderas de los tres tipos de uso de suelo.

Los bosques primarios, están dominados por árboles caducifolios con una altura de 4 a 15 metros que bien podrían corresponder a una selva baja caducifolia. Las especies arbóreas más comunes son: *Bursera* spp., *Jatropha standlleyi*, *Caesalpinia eriostachys*, *C. coriaria*, *Cordia alliodora*, y *Lonchocarpus constrictus* (Lott 1985). La biomasa aérea total es de 416 Mg ha⁻¹ y el almacén de carbono total es de 306 Mg ha⁻¹ (Jaramillo et al., 2003).

Los potreros se encuentran ubicados en el ejido de San Mateo en el municipio de La Huerta, a 30 km al norte de la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuitzmala, en el estado de Jalisco. Después de la transformación del bosque primario por roza-tumba-quema se siembran los pastos guinea (*Panicum maximum* Jacq.) y buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), usados como forraje para el ganado (Gutiérrez-Alcalá 1993). El uso intensivo de las praderas ha reducido los contenidos de materia orgánica del suelo en un 20 % (García-Oliva et al., 1994) afectando los mecanismos de estabilidad de agregados (García-Oliva et al., 1999a) incrementando la erosión del suelo y reduciendo la capacidad amortiguadora del pH en el suelo (García-Oliva et al., 1995; Nava-Medoza et al., 2000).

Los sitios de bosque secundario están ubicados en el ejido de Quémaro en el km 10 y 20, al Norte de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala, en el estado de Jalisco. Estos sitios tuvieron 6 años iniciales de uso ganadero, y un tiempo de regeneración natural de 26 años. Estos sitios están dominados por una especie de leguminosa, *Mimosa arenosa*, la cual no se encuentra en el bosque primario (Romero-Duque L. et al., Com. pers.). Las características de los suelos de estos sitios no han sido documentadas.

En todos los sitios se eligieron laderas debido a que la mayor parte del sistema en donde se realizó el estudio presenta un relieve dominado por estas unidades topográficas. Con la intención de reducir la variación entre unidades de muestreo (parcela), se colocaron tres parcelas dentro de cada sitio en laderas con pendiente similar (31% en bosque primario, 21% en bosque secundario, y 17 % en potreros), forma (convexa) y orientación (Sur).



Foto 1. Bosque primario. A la izquierda la rep. BP1 (Tejón) y a la derecha la rep. BP2 (Búho).



Foto 2. Bosque secundario. A la izquierda la rep. BS1 (Guayabilloso) y a la derecha la rep. BS2 (La Abuela)



Foto 3. Potrero. A la izquierda la rep. P1 (Estanque) y a la derecha la rep. P2 (Cerrito).

La orientación sur fue elegida debido a que estas unidades topográficas reciben un similar índice anual de radiación solar (IRS) y presentan una demanda evaporativa parecida, lo que permite minimizar el efecto de esta variable dado que la radiación solar controla un 90

% del nivel de humedad de suelo (Galicia et al., 1999). Todas las parcelas se encuentran sobre el mismo material parental (Rioilita) y tipo de suelo (Regosol).

5.2. Diseño experimental y muestreo de suelo

El suelo fue colectado en el año 2005 (Cuadro 1). El 2005 presentó una precipitación anual de 334 mm que está por abajo del promedio anual registrado en otros trabajos: 746 mm (García-Oliva et al., 2002).

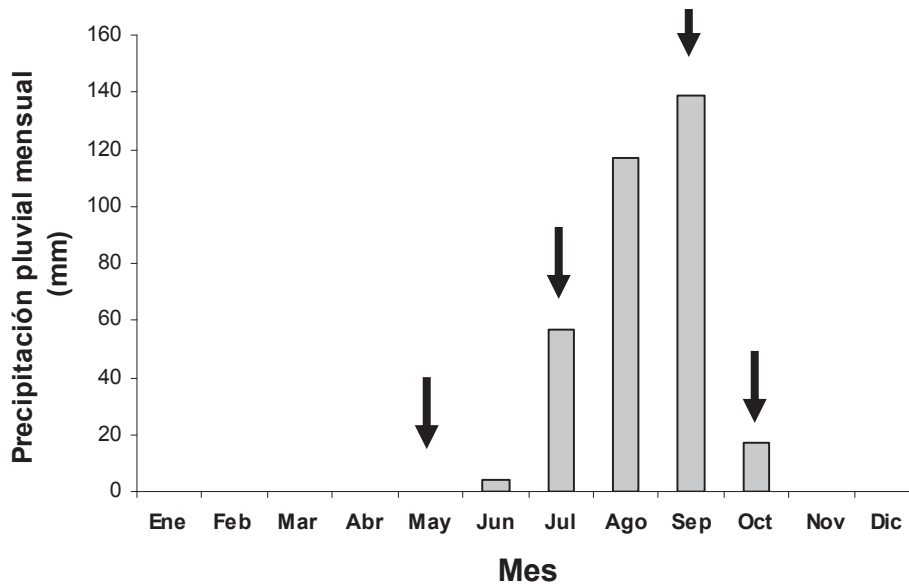


Figura 2. Precipitación pluvial mensual del año 2005 en Chamela, Jalisco, México. Las flechas oscuras indican los meses que se realizaron los muestreos.

Cuadro 1. Fechas que se realiza la toma de muestras de suelo

Mes	Año	Época
Mayo	2005	Seca
Julio	2005	Inicio de lluvias
Septiembre	2005	Mitad de lluvias
Octubre	2005	Finales de lluvias

En cada repetición (BP1, BP2, BS1, BS2, P1, P2) se establecieron tres parcelas de 10 x 15 m, a lo largo de la pendiente, las tres parcelas dentro de cada cambio de uso de

suelo fueron divididas en tres secciones, parte alta, media y baja de la pendiente. Se eligieron al azar 5 puntos por sección para obtener un total de 15 submuestras por parcela y tener una muestra representativa de cada parcela. En cada cuadro se removió el mantillo y se colectó suelo de los primeros 10 cm de profundidad, las 15 submuestras de suelo se mezclaron para formar una sola muestra compuesta. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico negras y se mantuvieron a 10° C hasta llegar al laboratorio, donde se tamizaron con una malla de 4 mm para remover material vegetal, piedras o arena gruesas y posteriormente se almacenaron en el refrigerador a 4° C hasta su procesamiento.

Cuadro 2. Descripción y antecedentes de manejo de los sitios de estudio.

	Sitio	Ubicación	Año de disturbio	Tiempo de disturbio	Años en uso	Tipo de uso	Abandono	Regeneración
Bosque Primario (Bp)	Tejón (Bp1)	Estación Chamela	Conservado	Ninguno	0	Reserva		Vegetación Primaria
	Búho (Bp2)	Estación Chamela	Conservado	Ninguno	0	Reserva		Vegetación Primaria
Bosque secundario (Bs)	Guayabiloso (Bs1)	Quemaro	1973	MQ	6	G	1979	26 años
	La abuela (Bs2)	Quemaro	1973	MQ	6	G	1979	26 años
Potrero (P)	Estanque (P1)	San Mateo	1979	RTQ	26	G	En uso	Ninguna
	Cerrito (P2)	San Mateo	1979	RTQ	26	G	En uso	Ninguna

MQ = Tumba con maquinaria y quema. G = Ganadería. RTQ = Roza, Tumba y Quema

5.3. Métodos analíticos: análisis de laboratorio

5.3.1. Determinación de porcentaje de humedad y pH

Para cada una de las muestras se calculó la humedad pesando una submuestra de 50 g y secándola en un horno a 75 °C por 48 horas, y el porcentaje de humedad fue calculado por el método gravimétrico. El pH activo del suelo fue medido en una relación 1:10 p/v usando agua desionizada y un potenciómetro (Corning) previamente calibrado.

5.3.2. Determinación de C, N y P total del suelo

Se tomó una submuestra de 20 g de suelo seco que fue molida en un mortero de ágata para la cuantificación de los nutrientes totales del suelo. El C total fue determinado con un autoanalizador de C por un método coulométrico (UIC, mod. CM5012). Para el N total se pesaron 5 g de suelo que se digirieron en un medio ácido por el método macro-Kjeldahl y los extractos fueron leídos por colorimetría en un auto-analizador (Braun+Luebbe Auto Analyzer III, Germany; método No. 696-82W; Technicon Industrial System 1977). Para el P total se pesaron 5 g de suelo, se digirieron en un medio ácido y los extractos fueron leídos en un auto-analizador Braun+Luebbe Auto Analyzer III, por el método colorimétrico de molibdato después de una reducción con ácido ascórbico (Technicon Industrial System 1977; Murphy y Riley, 1962). Las formas totales del suelo se determinaron sólo para dos fechas.

5.3.3. Determinación de nutrientes disponibles del suelo

Las formas de C lábil del suelo fueron tratadas con 333 mM de permanganato de potasio (KMnO₄) para oxidar una proporción del carbón lábil y fue determinado por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 565 nm por el método propuesto por Blair et al., (1995). Por cuestión metodológica sólo se obtuvieron las formas de C lábil para

la estación de seca y lluvias. Las formas inorgánicas disponibles de N (NH_4^+ y NO_3^-) fueron extraídas con KCl_2 2 N, los extractos fueron filtrados a través de un papel Whatman N°1 (Robertson et al.,1999) y determinados por colorimetría con un auto-analizador III-Bran+Luebbe (Technicon Industrial System 1977). Las concentraciones de P inorgánico (PO_4^+) se obtuvieron con el método Olsen, usando una solución extractora de bicarbonato de sodio 0.5N ajustada a un pH de 8.5 seguida de una medición por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 882 nm (Olsen et al., 1954). El N y P disponible se determinaron en las cuatro fechas del muestreo para conocer la dinámica de disponibilidad estacional.

5.3.4. Determinaciones enzimáticas

Se determinó la actividad enzimática para deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa del suelo de todos los sitios en las cuatro fecha para cuantificar su variación temporal.

5.3.4.1. Determinación de la actividad de la deshidrogenasa del suelo

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo con el método de García et al., (1997). Se pesaron 0.1 g de suelo humedeciendo al 60 % de su capacidad de retención hídrica y se agregó 0.2 ml de INT (2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride) al 0.4 % en agua destilada; finalmente se incubó por 22 horas a temperatura ambiente en un cuarto oscuro para formar el INTF (yodo-nitrotretrozolium formazán). Después del periodo de incubación se agregaron 10 ml de metanol y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5000 r.p.m por 15 minutos. El INTF fue determinado por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 490 nm. Previo a esta determinación se realizó una curva de calibración (Anexo 1). La actividad de deshidrogenasa fue expresada en μg de INTF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

5.3.4.2. Determinación de la actividad de la ureasa del suelo (urea amidohidrolasa EC 3.5.1.5)

La actividad de la ureasa se determinó de acuerdo con el método de Fawcett y Scout (1960). Se pesaron 2 g de suelo se le añadieron 2.5 ml de buffer maleico-NaOH 0.02 M a pH 6.5 y 2.5 ml de sustrato de urea a 0.02 M. Las muestras se preincubaron por 75 minutos a 25 °C con continua agitación, después de este periodo de tiempo se centrifugaron a 400 revoluciones por 10 minutos. Se tomaron 2 ml del sobrenadante y se agregaron 5 ml de Fenol Nitroprusido de sodio (5% peso /volumen) y 5 ml de hipoclorito alcalino (0.2% peso/volumen) agitando manualmente por 30 segundos y finalmente se incubaron a 37 °C por 15 min. El producto de esta reacción (indofenol) de color azul se determinó a una longitud de onda de 570 nm. Previo a esto se realizó una curva de calibración utilizando una solución estándar de sulfato de amonio de 100 ppm (Anexo 2). La actividad de la ureasa se expresó en μg de NH_4^+ g^{-1} h^{-1} .

5.3.4.3. Determinación de la actividad de la fosfatasa del suelo (orfosfórico monoéster fosfohidrolasa EC 3.1.3.2)

La actividad de la fosfatasa ácida fue determinada usando como sustrato 0.5 ml de *p*-NFF (*p*-nitrofenil fosfato disodico) 0.115 M y 2 ml de tampón maleato 0.1 M ajustado a pH 6.5 que fueron agregados a una muestra de 0.5 g de suelo, la cual posteriormente se incubó por 1 hora a 37° C, con agitación continua. Después del tiempo de incubación se detuvo la reacción por enfriamiento a 4 °C por 15 minutos, pasando este periodo se agregó 0.5 ml de CaCl_2 0.5 M y 2 ml de NaOH 0.5 M agitando por 30 segundos para finalmente centrifugar a 3500 revoluciones por 10 minutos. El *p*-nitrofenol (*p*-NF) se determinó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 398 nm. (Tabatabai y Bremner, 1969).

Previamente se realizó una curva de calibración usando una solución de *p*-NF la cual se trató como todas las muestras (Anexo 3). La actividad fue expresada en μg de *p*-NF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

5.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con un Análisis de varianza de medidas repetidas (RMANOVA). El factor principal fue uso de suelo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P), con dos repeticiones por sitio (BP1 y BP2, BS1 y BS2, P1 y P2) resultado del promedio de las tres parcelas dentro de cada repetición. Las fechas de muestreo (seca, inicio de lluvias, mitad de lluvias y finales de lluvias) fueron consideradas como las medidas repetidas. De esta manera, sólo se puede hablar de un efecto de uso de suelo o fecha cuando la interacción cambio de uso de suelo x fecha no es significativa. Cuando se encontraron diferencias significativas en cualquiera de los factores se usó una prueba de comparación múltiple Tukey's HSD para detectar diferencias significativas entre los promedios (Sokal y Rohlf, 1995). Los datos fueron transformados para satisfacer los supuestos de la distribución normal y homogeneidad de las varianzas cuando así se requirió (Sokal y Rohlf, 1995). Sin embargo, en todos los casos los resultados se reportan en su escala original de medición. Todos los análisis se realizaron en el programa Statistica Vers. 6 y los promedios se consideraron como diferentes con una $p \leq 0.1$.

6. RESULTADOS

En los cuadros 3 y 4 se muestran las variables, los valores de F y sus niveles de significancia resultantes del análisis para los datos con dos y cuatro fechas de muestreo, respectivamente. Para las variables presentadas en el cuadro 3, el efecto de uso de suelo resultó significativo en la concentración de P total, y los cocientes C:N y C:P, mientras que el efecto de fecha y la interacción no fueron significativos para ninguna variable. Las interacciones uso de suelo x fecha fueron significativas en varios casos, como pH, humedad, en las concentraciones de amonio y ortofosfato y en la actividad enzimática de la deshidrogenasa y la fosfatasa. En la mayoría de estas variables el efecto de fecha fue más significativo que el de uso del suelo.

Cuadro 3. Valores de F y sus niveles de significancia con un ANOVA con medidas repetidas para las variables del suelo de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) de dos fechas en la Región de Chamela, México.

Grados de libertad	Fuente de variación		
	Uso de suelo (U)	Fecha (F)	C x F
	2 gl	1 gl	2 gl
Variables			
Carbono total	3.69 ^{ns}	3.9 ^{ns}	0.69 ^{ns}
Nitrógeno total	2.23 ^{ns}	1.31 ^{ns}	2.22 ^{ns}
Fósforo total	7.30 [*]	3.72 ^{ns}	1.56 ^{ns}
C:N	66.3 ^{***}	0.19 ^{ns}	0.15 ^{ns}
C:P	17.1 ^{**}	1.35 ^{ns}	5.01 ^{ns}
C lábil	1.30 ^{ns}	1.84 ^{ns}	0.12 ^{ns}

Los * indican diferencias significativas (* $p \leq 0.10$; ** $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.01$). ns= no significativo

Cuadro 4. Valores de F y sus niveles de significancia con un ANOVA con medidas repetidas para las variables del suelo de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) de cuatro fechas en la Región de Chamela, México.

Grados de libertad Variables	Fuente de variación		
	Uso de suelo (U)	Fecha (F)	C x F
	2 gl	3 gl	6 gl
pH	0.99 ^{ns}	2.68 ^{ns}	4.11 ^{**}
Humedad	5.614 [*]	88.3 ^{***}	4.53 ^{**}
Amonio (NH ₄ ⁺)	7.38 [*]	21.6 ^{***}	4.90 ^{**}
Nitrato (NO ₃ ⁻)	2.48 ^{ns}	42.2 ^{***}	2.5 ^{ns}
Ortofosfato (PO ₄ ⁻)	6.06 [*]	21.2 ^{***}	5.57 ^{***}
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺	2.86 ^{ns}	6.8 [*]	1.70 ^{ns}
PO ₄ ⁻ :P _t	5.83 [*]	114.6 ^{***}	7.14 [*]
Deshidrogenasa	7.68 [*]	26.2 ^{***}	5.79 ^{***}
Ureasa	3.75 ^{ns}	54.9 ^{***}	1.9 ^{ns}
Fosfatasa	11.3 ^{**}	2.63 ^{ns}	9.40 ^{**}

Los * indican diferencias significativas (* p ≤ 0.10; ** P ≤ 0.05; ***P ≤ 0.01). ns= no significativo.

6.1. pH y humedad del suelo

El pH fue ligeramente ácido, con poca variación y la interacción uso de suelo x fecha de muestreo fue significativa (Cuadro 4). Los valores de pH del suelo del bosque primario fueron más bajos en la fecha de inicio de lluvias y mayores en la fecha de finales de lluvias, mientras que los valores de pH del suelo de bosque secundario y potrero no variaron entre fechas (Cuadro 5). Sin embargo, la variación detectada fue muy pequeña (porque los datos de pH fueron muy estables) y, a pesar de que la interacción fue significativa, no se consideró que esa variación fuera de magnitud suficiente para concluir que las variaciones de pH tuvieran un significado biológico importante en la mayoría de las variables medidas.

La interacción uso de suelo x fecha fue significativa para el porcentaje de humedad (Cuadro 4). En la época seca, el suelo de bosque primario conservaba, aún después de 6 meses sin lluvia, mayor humedad que el de bosque secundario y potrero (Cuadro 5). Cuando

iniciaron las lluvias, los tres suelos tenían el mismo contenido de humedad. El mayor porcentaje de humedad del suelo fue el de la fecha de mitad de lluvias, donde el suelo de los bosques secundarios tuvo mayor humedad que los bosques primarios y los potreros. A finales de lluvias el uso de suelo tuvo un efecto más marcado sobre la humedad del suelo, donde el suelo de los bosques primarios tuvo más capacidad de retención de agua que el suelo de los bosques secundarios y los potreros (Cuadro 5).

Cuadro 5. pH y humedad del suelo con tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) en cuatro fechas.

Sitio	Seca	Inicio de Lluvias	Lluvias	Finales de Lluvias
pH				
BP	6.05 (0.12) ^a	5.96 (0.13) ^b	6.29 (0.15) ^a	6.40 (0.23) ^a
BS	5.82 (0.11) ^b	5.76 (0.20) ^b	5.99 (0.33) ^{ab}	5.90 (0.09) ^b
P	6.13 (0.19) ^a	5.99 (0.06) ^b	5.86 (0.09) ^b	5.92 (0.09) ^b
%Humedad				
BP	2.73 (0.57) ^c	7.45 (1.12) ^c	13.7 (3.53) ^b	9.47 (0.39) ^b
BS	1.05 (0.03) ^d	8.93 (0.62) ^c	19.4 (1.20) ^a	5.51 (1.05) ^c
P	0.91 (0.13) ^d	8.32 (1.59) ^c	11.3 (1.53) ^b	3.10 (0.46) ^d

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre sitios (columnas), en cada fecha.

6.2. CARBONO

Las concentraciones de carbono total y de carbono lábil no fueron afectadas por ninguno de los factores y no hubo interacción (Cuadro 3). Sin embargo, las tendencias de las concentraciones de carbono total, carbono lábil, nitrógeno total y fósforo total fueron similares. Aunque solamente alcanzaron significancia estadística para el P total, la consistencia de los datos de las cuatro variables sugiere que hay mayores concentraciones de los cuatro parámetros en los bosques primarios y que estos se reducen progresivamente en los bosques secundarios y en los potreros. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Carbono, nitrógeno, y fósforo total, carbono lábil y sus coeficientes (C:N y C:P) de tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) en dos fechas.

	Bosque primario (BP)	Bosque secundario (BS)	Potrero (P)
C _{total} (mg C g ⁻¹)	30.14 (2.5) ^a	26.68 (0.9) ^a	16.52 (0.7) ^a
N _{total} (μg N g ⁻¹)	3112.59 (17.6) ^a	2636.42 (251.8) ^a	1854.73 (55.6) ^a
P _{total} (μg P g ⁻¹)	552.45 (11.3) ^a	324.69 (26.2) ^{ab}	194.49 (27.5) ^b
C:N	10.52 (0.01) ^a	11.25 (0.2) ^a	8.91 (0.03) ^b
C:P	55.67 (5.3) ^b	82.66 (3.3) ^a	86.53 (8.2) ^a
C _{lábil} (mg C g ⁻¹)	0.90 (0.06) ^a	0.49 (0.09) ^a	0.42 (0.03) ^a

El cuadro 3 muestra que el cociente C:N fue afectado únicamente por el uso de suelo y fue mayor en el suelo de bosque primario y bosque secundario que en el suelo de potrero. (Cuadro 6).

El C:P también fue afectado únicamente por el uso de suelo (Cuadro 3). El bosque primario tuvo un cociente C:P más bajo que el bosque secundario y el potrero (Cuadro 6).

Hubo una interacción significativa para la actividad de la deshidrogenasa (DH), (Cuadro 4). La actividad DH fue menor en bosques secundarios que en bosques primarios y potreros en tres de las cuatro fechas (Figura 3). La actividad DH de los bosques primarios y los potreros fue de magnitud similar en general pero con tendencia diferente entre las fechas.

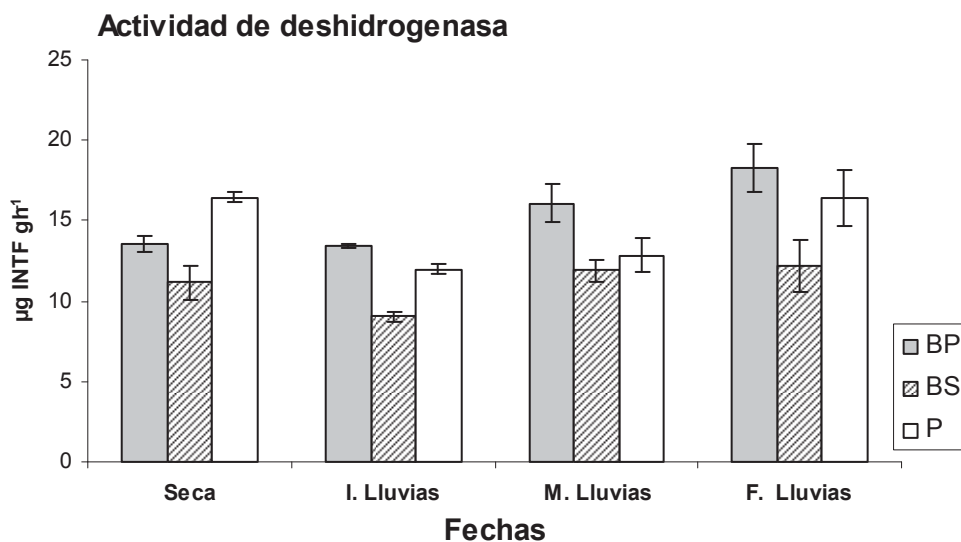


Figura 3. Variación estacional de la actividad enzimática de la deshidrogenasa del suelo con tres tipos de uso de suelo (bosque primario, bosque secundario y potrero) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

6.3 NITRÓGENO

Las concentraciones de nitrógeno total no fueron afectadas por ninguno de los factores, ni fue significativa la interacción (Cuadro 3) aunque, como se mencionó anteriormente, se mantuvo consistente la tendencia de disminución de bosque primario a bosque secundario y a potrero observada para los otros nutrientes totales (Cuadro 6). Hubo una interacción uso de suelo x fecha para las concentraciones de amonio (NH_4^+) (Cuadro 4). En secas e inicio de lluvias las concentraciones de amonio fueron las más altas y fueron mayores en suelo de potrero que en el de bosque primario (Figura 4a). A mitad de lluvias se observó una reducción grande en la cantidad de amonio en todos los uso de suelo y a finales de lluvias la mayor concentración de amonio fue para el suelo de bosque primario, seguido por el bosque secundario y después por el potrero (Figura 4a).

La fecha fue el único efecto significativo sobre las concentraciones de nitratos (NO_3^-) (Cuadro 4). Las mayores concentraciones de nitratos se presentaron al inicio y mitad de

lluvias (Figura 4b). La tendencia en las concentraciones de nitratos (NO_3^-), que no llegó a ser significativa como en los nutrientes totales, fue de disminución de bosque primario a bosque secundario y a potrero (Figura 4b).

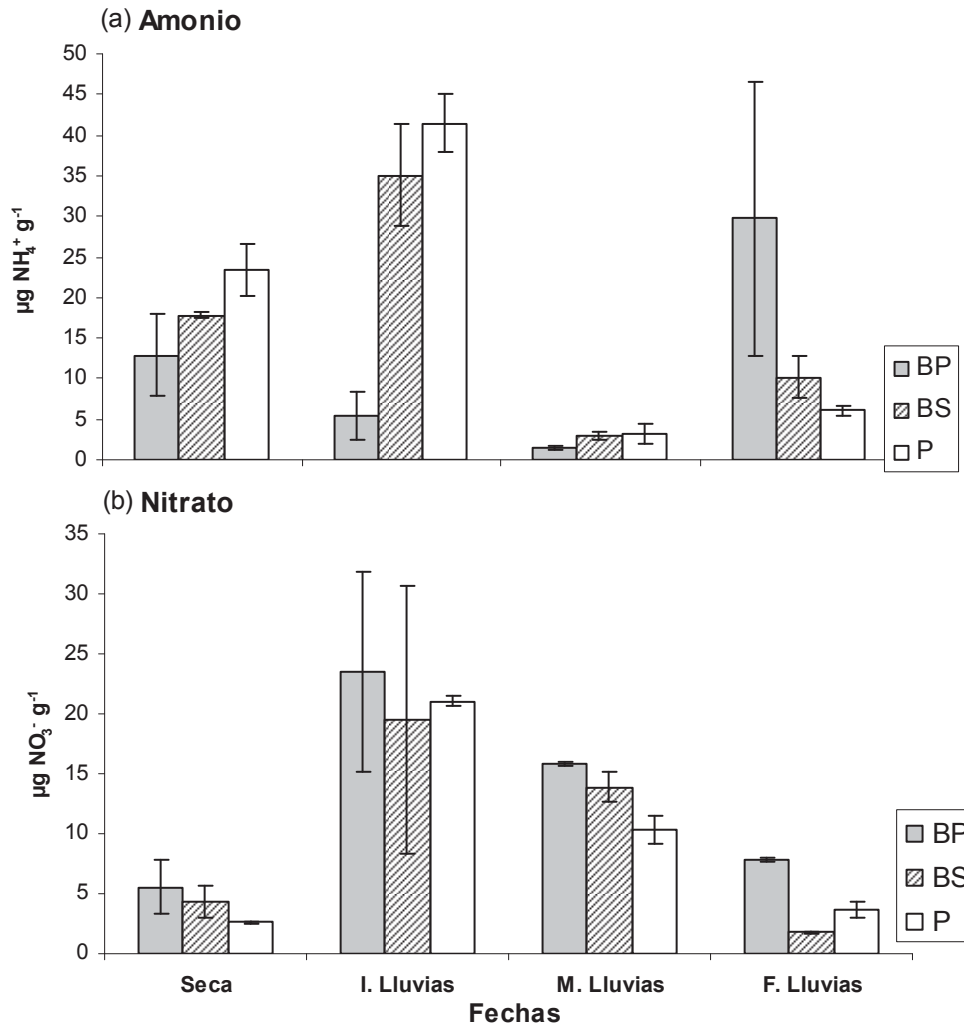


Figura 4. Variación estacional de las concentraciones de las formas disponibles de nitrógeno (a) NH_4^+ y (b) NO_3^- en el suelo con tres tipos de uso de suelo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

El cociente $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ fue afectado por la fecha únicamente (Cuadro 4). Este cociente fue mayor en el inicio y la mitad de lluvias y menor en la seca y final de lluvias (Figura 5).

En este caso también se presentó una tendencia no significativa de mayor nitrato por cada amonio para el suelo de bosque primario que el de bosque secundario y potrero en dos de las cuatro fechas (Figura 5).

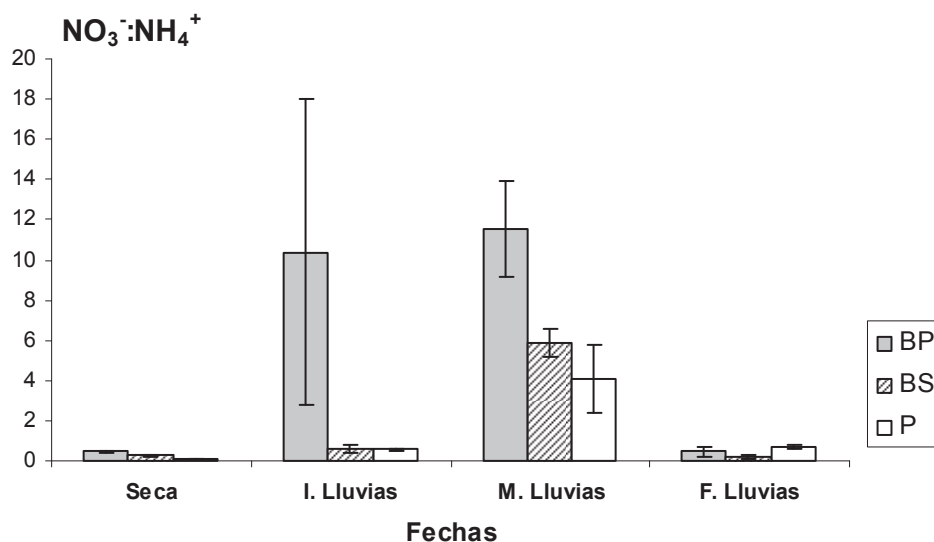


Figura 5. Variación estacional del cociente nitrato:amonio ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) del suelo con tres tipos de uso de suelo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

La actividad de ureasa fue, en contraste con la deshidrogenasa, marcadamente estacional y disminuyó progresivamente de la estación seca hasta la mitad de lluvias, y aumentó nuevamente a finales de lluvias (Cuadro 4). El efecto de uso de suelo no alcanzó a ser significativo para la actividad de la ureasa, aunque nuevamente se observó la tendencia de disminución progresiva de manera consistente en las cuatro fechas (Figura 6).

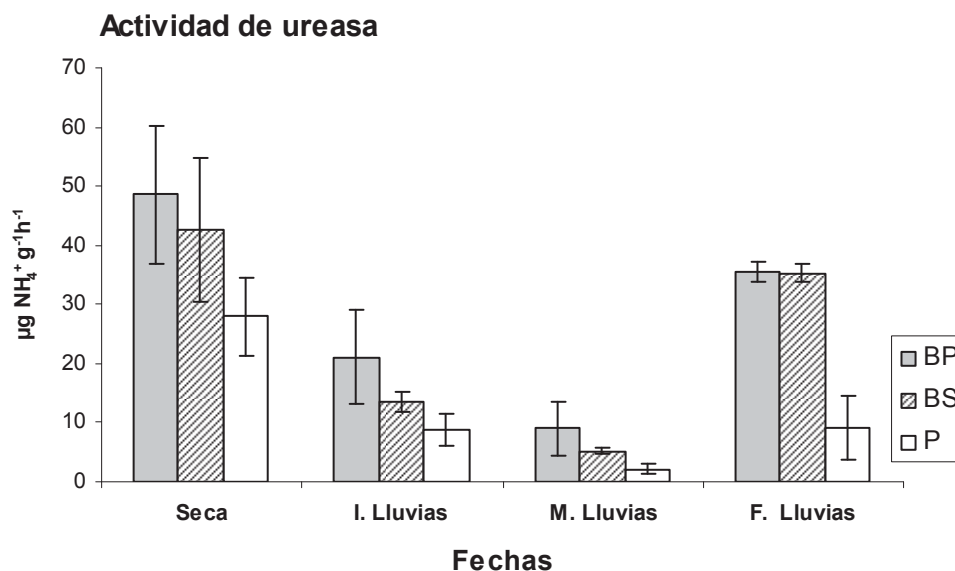


Figura 6. Variación estacional de la actividad enzimática de la ureasa del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

6.4 FÓSFORO

El uso de suelo tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de fósforo total (Cuadro 3). Las concentraciones de P total fueron mayores en el suelo de bosque primario, intermedias en el suelo de bosque secundario y menores en el suelo de potrero (Cuadro 6).

La interacción uso de suelo x fecha fue significativa para la concentración de ortofosfato (PO_4^-), (Cuadro 3). Las concentraciones de ortofosfato en todas las fechas fueron mayores para el bosque primario que para el bosque secundario y potrero y aumentaron hacia el final de las lluvias, mientras que en bosque secundario y potrero el efecto estacional fue menor (Figura 7).

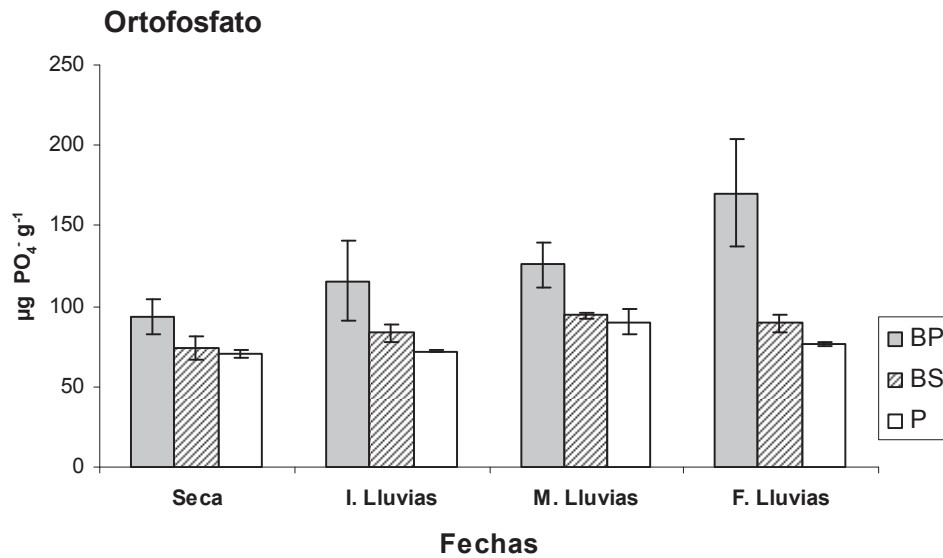


Figura 7. Variación estacional del ortofosfato (forma disponible de fósforo) del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

La interacción uso de suelo x fecha fue significativa para el cociente fósforo disponible: fósforo total ($PO_4^{3-}:P_t$) (Cuadro 4).

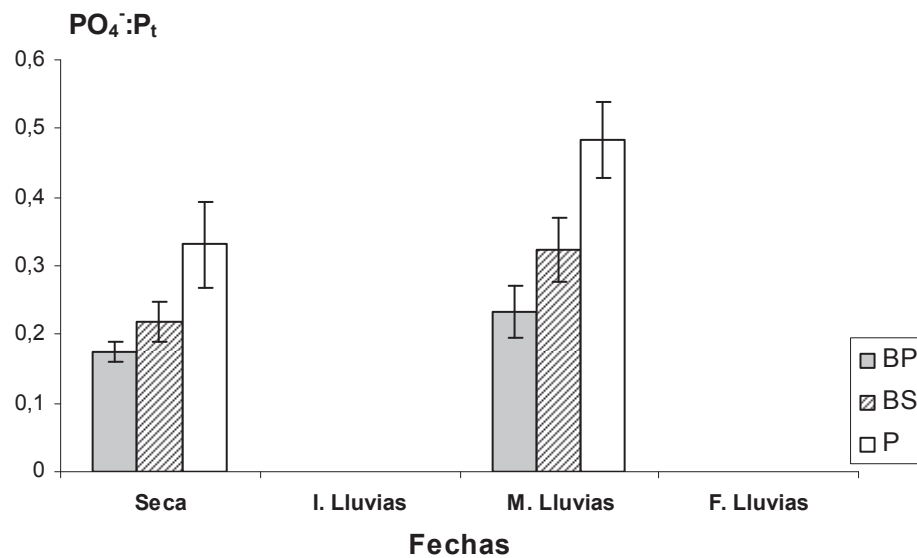


Figura 8. Variación estacional del cocientes ortofosfato: fósforo total ($PO_4^{3-}:P_t$) del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

El cociente $PO_4^+ : P_t$ fue ligeramente mayor en la mitad de lluvias que en la estación seca y fue mayor en suelo del potrero que en el suelo de bosque primario y bosque secundario (Figura 8). El bosque secundario y el primario, a pesar de seguir la tendencia de aumento progresivo, no fueron claramente diferentes entre sí en esta variable.

La interacción uso de suelo x fecha fue significativa para la actividad de la fosfatasa (Cuadro 3). La actividad de la fosfatasa fue similar en bosque primario y bosque secundario y mayor que en los potreros en todas las fechas. La actividad de fosfatasa disminuyó en la mitad de lluvias en el bosque secundario, pero no en el bosque primario. Los suelos de potrero presentaron una baja actividad de fosfatasa constante en todas las fechas (Figura 9).

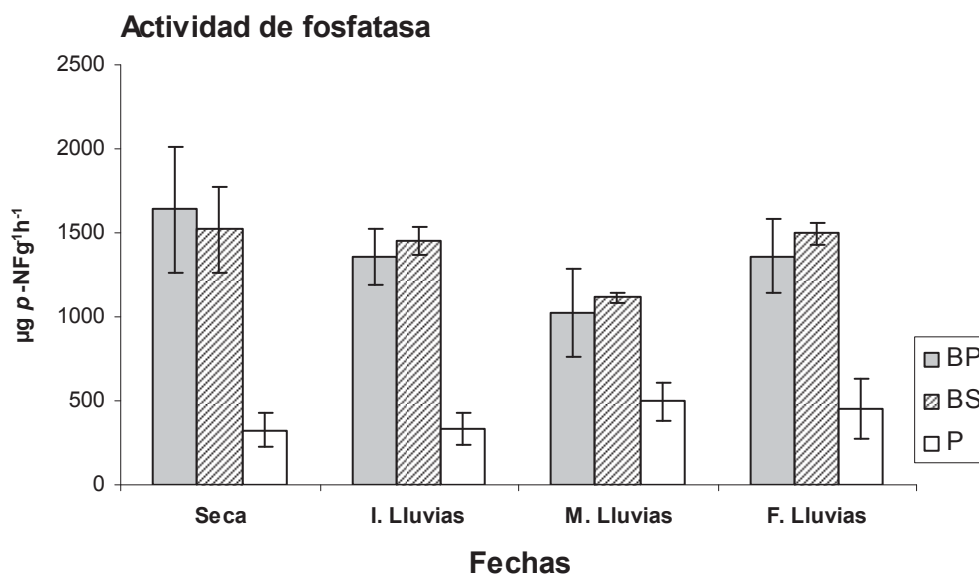


Figura 9. Variación estacional de la actividad enzimática de la fosfatasa del suelo con tres tipos de uso de suelo y dos sitios de cada tipo: bosque primario (BP), bosque secundario (BS) y potrero (P) en un ecosistema tropical seco de la región de Chamela, México.

7. DISCUSIÓN

En este estudio, como en otros estudios realizados en ecosistemas tropicales distintos o en otros contextos de uso de suelo, ha sido útil la evaluación de los contenidos de nutrientes y actividades enzimáticas para determinar el estado de los procesos biogeoquímicos en el suelo. A pesar de que la baja replicación del diseño experimental no permitió separar estadísticamente las diferencias en algunos casos, la consistencia en las tendencias indica que la dirección de los procesos en los bosques secundarios es hacia la recuperación. Las tendencias observadas en los nutrientes totales fueron consistentes en indicar que los potreros tienen almacenes menores que los bosques primarios y que los bosques secundarios tienen niveles intermedios.

El C total se redujo hasta en un 45%, el N total 40% y el P total 64%, en el suelo de potrero con respecto al bosque primario. No obstante, el C total, C lábil y N total en los bosques secundarios fueron más similares a los de los bosques primarios que a los de los potreros. En contraste, el P total, el nitrato y el ortofosfato son más similares entre el bosque secundario y el potrero, lo cual sugiere que estos no se han recuperado aún después de 26 años de regeneración. Las similitudes en C y N total entre el bosque secundario y primario pueden estar asociadas a una entrada de materia orgánica más parecida por su mayor riqueza de especies y la presencia de leguminosas como *Mimosa arenosa* (Romero-Duque y Jaramillo *com. pers.*). Las leguminosas son capaces de fijar nitrógeno y aportan grandes cantidades de este nutriente a través de su hojarasca mejorando la calidad del material orgánico (Saynes et al., 2005). La abundancia de las leguminosas leñosas y la entrada del ganado en los potreros y los bosques secundarios pueden ser algunas de las razones por las que el cociente C:N fuera tan parecido entre los tres tipos de uso de suelo, a pesar de las grandes diferencias en su producción de materia orgánica y disponibilidad de nitrógeno en el suelo.

Las tendencias opuestas observadas en los cocientes C:N y C:P indican, como ya han reportado otros estudios, que el fósforo es un elemento más escaso y limitante en el bosque primario que en los bosques secundarios y potreros, mientras que el nitrógeno es más abundante en el bosque primario y secundario y se reduce en los potreros. De esta manera, los resultados sugieren que los bosques secundarios tienen buenas condiciones para favorecer la actividad microbiana y los procesos del suelo. El que no existiera un efecto estacional sobre los nutrientes totales indicó que estos almacenes son estables en los tres tipos de uso de suelo y cambian poco con los pulsos de humedad, dado que incluyen formas orgánicas químicamente más complejas y recalcitrantes que son de difícil descomposición (Paul y Clark, 1989).

Se esperaba que los nutrientes disponibles fueran mayores en la estación seca cuando hay acumulación y que disminuyeran durante la estación de crecimiento cuando es mayor la actividad de plantas y microorganismos. Se ha reportado que el C lábil en el bosque primario es 50% mayor en la estación seca que en la estación de lluvias (García-Oliva et al., 2003), sin embargo, los datos de este estudio no presentaron este patrón. Esto es debido probablemente a que el año 2005 fue muy seco y la baja entrada de agua al suelo pudo haber limitado la disolución de compuestos orgánicos acumulados en la estación seca. La importancia de los pulsos de humedad en la dinámica de nutrientes ya ha sido reportada previamente para el bosque tropical seco (Lodge et al., 1994).

También se esperaba que la concentración de amonio y nitrato fuera mayor durante la estación seca, como ha sido previamente reportado (Raghubanshi 1992; Saynes et al., 2005). Los datos de este estudio apoyan dicha hipótesis en el caso de la concentración de amonio, pero no en la del nitrato. La acumulación de amonio en el suelo en la fecha de seca puede estar asociada a la entrada y acumulación de material orgánico durante este periodo y

a que pueden estar dominando procesos de amonificación. En el caso del potrero y el bosque secundario, también puede estar relacionado a la entrada de ganado que puede estar aportando una importante cantidad de amonio a través de la orina y excrementos. En contraste, la mayor concentración de nitrato en el suelo de la estación húmeda, particularmente al inicio de lluvias, sugiere que ocurrió una rápida oxidación del amonio a nitrato (nitrificación) probablemente estimulada por el humedecimiento del suelo. El alto cociente $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ en la mitad de lluvias en los tres tipos de uso de suelo indica que el NH_4^+ que entró al inicio de lluvias fue nitrificado, lo cual podría favorecer pérdida del N del suelo por desnitrificación o lixiviación de nitratos (García-Méndez et al., 1991). Una mayor nitrificación en el suelo de la estación lluviosa ya ha sido reportada en estos bosques tropicales (Singh et al., 1989; García-Méndez et al., 1991; Saynes et al., 2005).

El P disponible en bosque primario fue mayor al finalizar la estación húmeda. Otro estudio realizado en el bosque primario en Chamela indica que el P disponible se acumula en la estación seca y es más bajo en la estación húmeda (Campo et al., 1998). Sin embargo, los datos de este estudio no mostraron este patrón estacional. El aumento del ortofosfato en la estación húmeda pudo ser por liberación de P a partir de la muerte microbiana por lisis celular y depredación (Campo, 1995; Singh et al. 1989; Jaramillo y Sanford 1995), debido a la baja precipitación del año 2005.

Se esperaba que los nutrientes disponibles disminuyeran en los sitios más perturbados con respecto al bosque primario, aunque esta suposición no pudo estar basada en algún estudio anterior y fue más bien una hipótesis generada teóricamente por la degradación evidente del suelo de los sitios. Los datos de este estudio apoyaron en general esta hipótesis. El efecto del uso de suelo no alcanzó a tener significancia estadística en varios casos., Sin embargo, las tendencias fueron muy consistentes y mostraron que en general los nutrientes disponibles, a excepción del amonio, sí disminuyeron en el bosque

secundario y aún más en el potrero. Las reducciones en los nutrientes totales y disponibles en los sitios transformados coinciden con lo reportado en otros trabajos (Srivastava y Singh 1991; Prasad et al., 1994; García-Oliva et al., 2006). Algunos factores que pueden explicar tendencias de una reducción en los nutrientes del suelo de potrero son: (1) una disminución de la materia orgánica, que se ha reportado hasta del 30 % después de 11 años de uso ganadero continuo (García-Oliva y Maass, 1998), (2) la productividad primaria neta en los potreros es más baja que en los bosques primarios (9 y 12 Mg ha⁻¹ año⁻¹; Martínez-Yrízae et al., 1996), (3) una gran parte de la producción de biomasa aérea de los potreros y bosques secundarios puede ser consumida por el ganado, (4) se ha reportado que la roza tumba y quema degrada los mecanismos que protegen la materia orgánica y por lo tanto reduce la disponibilidad de los nutrientes y de C (García-Oliva et al., 1999b), y (5) el uso agropecuario también reduce la cantidad de macroagregados del suelo, los cuales protegen las formas orgánicas de nutrientes (García-Oliva et al., 2006).

La falta de recuperación del P total y las formas disponibles de P y N puede deberse a los cambios originados por el uso de suelo, como los de la estructura del suelo, que puede llevar a una reducción de hasta 35 % de los macroagregados de los potreros (García-Oliva et al., 2006) la pérdida del 68 % de la biomasa subterránea (raíces) y del 63 % de C asociado a esta biomasa (Rentería 1997), teniendo como consecuencia una reducción de la energía disponible para la actividad microbiana, la cual es fundamental en los procesos de disponibilidad de estos nutrientes.

La actividad de las tres enzimas estudiadas no aumentó, como se esperaba en general, durante la estación de lluvias pero su concentración si disminuyó en los suelos perturbados con respecto a los bosques primarios. La actividad de la deshidrogenasa (DH) tendió a aumentar durante la estación húmeda en el bosque primario y en menor grado en el potrero, pero no en el caso del bosque secundario. En el bosque secundario la actividad DH

fue menor que en bosque primario y potrero en tres de las cuatro fechas. Esto puede ser explicado por la entrada más regular e intensa de ganado al potrero que puede estar aportando material orgánico en descomposición a través del excremento que puede contener una carga microbiana aumentando así la actividad de DH, ya que esta enzima está ligada a procesos microbianos de oxidación de compuestos orgánicos y es dependiente de la disponibilidad de C (Tabatabai, 1994). La actividad similar de la DH en el suelo de potrero y de bosque primario también puede ser explicada en parte porque la actividad biológica de esta enzima se asocia a un pH neutro como el de estos suelos (Martínez-Cruz et al., 2001), y a que probablemente los suelos de potrero presenten un aporte significativo de C como consecuencia de una mayor producción de raíces finas (González Monterrubio, com. personal)..

Los valores altos de la actividad de la ureasa en la fecha de seca en los tres tipos de usos de suelo de este estudio pueden estar asociados a una mayor actividad de microorganismos ureolíticos en respuesta a la acumulación de materia orgánica y sustratos orgánicos nitrogenados durante este periodo. Su reducción en lluvias puede deberse a una menor cantidad de materiales orgánicos (mantillo) los cuales disminuyen por descomposición cuando la humedad del suelo aumenta (Martínez-Yrizar y Sarukhán, 1990; Anaya, 2006). Asimismo, la actividad más baja de la ureasa se observó en el inicio y mitad de lluvias, durante e inmediatamente después de que se registró la mayor concentración de amonio. Esto concuerda con lo reportado por McCarty et al. (1992) quienes encontraron que la actividad de la ureasa en el suelo disminuye cuando aumenta la concentración de amonio.

La actividad de la ureasa disminuyó en los sitios más perturbados (potreros) con respecto al bosque primario. Esta disminución puede estar asociada a la reducida cantidad de C. a pesar de tener concentraciones altas de amonio en el suelo de potrero. La entrada de ganado tanto a los potreros como a bosques secundarios puede estar aportando una

importante cantidad de amonio a través de la orina y excrementos. Es común que en la región se usen los bosques secundarios y potreros para pastoreo de vacas bajo un uso intensivo (Gutiérrez 1993; García-Oliva y Maass 1998).

En general la fosfatasa no aumentó para mitad de lluvias húmeda y se mantuvo en niveles similares durante el periodo evaluado. Se ha reportado una mayor actividad de fosfatasa en la época seca en un bosque húmedo de Panamá (Yavitt et al., 2004), pero no hay registros para bosques secos. Considerando que la fosfatasa tiene una relación inversa con la concentración de fósforo disponible (PO_4^-) la presencia de este producto en el suelo probablemente inhibió la actividad de la enzima. Asimismo, el C lábil no cambió estacionalmente, por lo que la producción microbiana de esta enzima pudo mantenerse sin cambios importantes entre fechas. Varios estudios mencionan que los cambios en la disponibilidad de C podrían reducir la producción de estas enzimas (Olander y Vitousek 2000; Allison y Vitousek 2005). La hipótesis del efecto del C lábil sobre la fosfatasa parece cumplirse únicamente con los cambios en la concentración de C lábil generados con el uso de suelo. Por ejemplo, los suelos de potrero que tuvieron la menor concentración de C lábil presentaron una actividad baja de la fosfatasa. Además, los suelos de los potreros tienen una menor densidad de plantas que los bosques primarios y secundarios. Dado que estas enzimas también son producidas por las plantas (Paul y Clark 1989; Alexander 1994), una menor presencia de estas en los suelos de potrero pudo contribuir también a una baja actividad de la fosfatasa. En el caso de los bosques secundarios, los suelos tuvieron una actividad de fosfatasas similar a bosque primario, lo cual puede estar asociado a una mayor densidad de plantas y una vegetación más parecida entre estos bosques. García et al, (2005), han reportado que las plantas de diferentes especies promueven acciones y procesos del suelo de manera diferencial.

La relación más consistente entre las variables estudiadas y el uso de suelo se observó en el caso del fósforo, en el que el P total, el P disponible y la actividad de fosfatasa mostraron un patrón claro y consistente y más independiente de la fecha de muestreo. Esto sugiere que las mediciones asociadas a este elemento podrían ser más útiles como herramienta de diagnóstico del estado de los procesos biogeoquímicos en este ecosistema que aquellas asociadas al carbono o el nitrógeno, que muestran o una variación estacional demasiado grande o una consistencia menor entre las variables asociadas.

En general los resultados sugieren que las actividades de la ureasa y fosfatasa, usando como referencia a los bosques primarios, son similares en los bosques secundarios mostrando una tendencia a la recuperación de los procesos biogeoquímicos para estos sitios y que la actividad disminuye con la perturbación y disponibilidad de carbono.

Los resultados del ANOVA mostraron que las variables más afectadas por el uso de suelo son el fósforo total, las actividades de la fosfatasa, y los cocientes C:N y C:P. Las variables más afectadas por la fecha de muestreo fueron el porcentaje de humedad, las formas disponibles de nitrógeno, los cocientes $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, $\text{PO}_4^+:\text{P}_t$ y la actividad de deshidrogenasa y ureasa.

Aunque McGrath et al (2001) evaluaron que las concentraciones de C, N Y P total aumentan muy lentamente en bosques secundarios brasileños al abandonar las practicas agrícolas, Mc Donald y Healey (2000) observaron que el ciclaje de nutrientes en bosques secundarios con 20 años de sucesión en Jamaica se encontraba ya en proceso de recuperación. Los resultados de la actividad enzimática también coinciden con los reportados por Caldwell et al. (1999) en los que las actividades de beta-glucosidasa y fosfomonoesterasa fueron mayores en testigos con bosque tropical y disminuyeron en bosques con remoción anual de vegetación y aún más en suelo sin vegetación. La evaluación de los contenidos de nutrientes y actividades enzimáticas para determinar el

estado de los procesos biogeoquímicos en el suelo se ha usado también para comparar, por ejemplo, bosques con plantaciones monoespecíficas (Dinesh et al., 2004) o agroecosistemas convencionales con sistemas agroforestales (Chander et al., 1998), en los que también se ha encontrado que los contenidos de nutrientes y las actividades de deshidrogenasa, ureasa y fosfatas han sido buenos indicadores de los procesos del suelo a largo plazo. Peñuela y Drew (2004), usando índices basados en las propiedades hidrológicas del suelo y la estructura del bosque, observaron que bosques secundarios de 20 años se habían recuperado en un 60% con respecto al bosque primario, mientras que la recuperación de praderas activas era de solo un 20 %. Este tipo de estudios, y el que se realizó en este trabajo, demuestran el potencial de algunos indicadores químicos y biológicos como herramientas de diagnóstico de procesos biogeoquímicos en ecosistemas manejados.

Como se ha discutido, existen muchos tipos de indicadores y es necesario evaluar cuáles son los mejores para cada sistema y contexto de cambio o de manejo, por lo que aún quedan otros tipos de indicadores por explorar.

CONCLUSIÓN

- Los almacenes totales de C, N y P en el suelo, no presentaron variación estacional y sugieren una tendencia a la recuperación en los bosques secundarios, mientras que las formas disponibles son más dinámicas y disminuyen en los suelos de los sitios con más perturbación. En general los valores más altos para los nutrientes totales y disponibles se encontraron para los bosques primarios y los más bajos para los potreros.
- El uso prolongado de suelo como bosques secundarios y potreros influye decisivamente en las formas totales y disponibles de C, N y P, y en la actividad biológica medida a través de las enzimas deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los parámetros bioquímicos, como la actividad enzimática de deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa que están involucradas en los ciclos de C, N, y P resultaron ser buenos indicadores de la dinámica que llevan los nutrientes. También fueron buenos estimadores del grado de recuperación de los procesos biogeoquímicos de los sitios que fueron transformados y cuyo uso de suelo ha sido diferente durante muchos años. La actividad de fosfatasa fue la que demostró estar menos influenciada por la variación estacional y más influenciada por el uso del suelo.
- Las variables del fósforo mostraron una mayor consistencia entre sí y esto sugiere, al igual que otros estudios, que este elemento es clave dentro de los procesos biogeoquímicos del ecosistema tropical seco. El fósforo en este ecosistema muestra una consistente sensibilidad a la perturbación y puede ser uno de los mejores elementos de diagnóstico, por lo que valdría la pena explorar más a fondo los procesos biogeoquímicos asociados este elemento en relación con el uso de suelo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor. México, D.F.
2. Allison, D.S. y Vitousek, P.M. 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 937-944.
3. Anaya, A.C y García-Oliva, F. 2006. Rainfall and labile carbon availability control litter nitrogen dynamics in tropical dry forest. *Oecologia* (en prensa).
4. Aon, M.A., Colaneri, A.C., 2001. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18: 255-270.
5. Asmar, F., Eiland, F., Nielsen, N.E., 1994. Effect of extracellular-enzyme activities on solubilization rate of soil organic nitrogen. *Biology and Fertility of Soil* 17: 32-38.
6. Baum, C., Leinweber, P., Schlichting, A., 2003. Effects of chemical conditions in rewetted peats temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology* 22:167-174.
7. Blair, G.J., Lefroy, R. D. B. y Lisle, L 1995. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of carbon management index for agricultural systems. *Australian Journal of Agriculture Research* 46: 459-1466.
8. Brady, N.C y Weil, R.R .2002. The nature and properties of soils. Prentice Hall Upper Saddle River, N.J. USA. *Soil enzymes* 775-833.
9. Bruce, A. Calwell; Robert, P. Griffiths; Phillip, Sollins 1999. Soil enzyme response to vegetation disturbance in two lowland Costa Rica soils. *Soil Biology and Biochemistry* 3: 1603-1608.
10. Bullock, S.H. y Solís-Magallanes, A.1990. Phenology of Canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 21: 22-35.

11. Burgos, A. Maass, J.M. 2004. Vegetation change associated with land-use in tropical dry forest areas of Western Mexico. *Agriculture Ecosystems and Environment* 104: 475-481.
12. Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427.
13. Campo, J. 1995. Ciclo de fósforo en ecosistemas tropicales estacional. Tesis Doctoral. UACPyP, Centro de Ecología, UNAM, México.
14. Campo, J., Jaramillo, V. y Maass, J.M. 1998. Pulses of soil phosphorus availability in a Mexican tropical dry forest: effects of seasonality and level of wetting. *Oecologia* 115: 167-172.
15. Castellanos, J., Jaramillo, V.J., Sanford, R.L. Jr. y Kauffman, J.B. 2001. Slash-and-burn effects on fine root biomass and productivity in a tropical dry forest ecosystem in Mexico. *Forest Ecology and Management* 5-280: 1-10.
16. Chander, K., Goyal, D., Nandal, P., y Kapoor, K.K 1998. Soil organic matter, microbial biomass and enzyme activities in tropical agroforestry system. *Biology and Fertility of soils* 27, 168-172.
17. Chapin, III F.S., Matson, P. A., Mooney, H. A. 2002. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag. New York. USA.
18. Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S., 2003. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 9-19.
19. Cotler H., E. Durán y Siebe, Ch. 2002. Caracterización morfo-edafológica y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio. Pp-17-79. *En: Noguera F., J. Vega, A. García y M. Quezada. Historia Natural de Chamela.* Instituto de Biología-UNAM.

-
-
20. Cotler, H., E. Durán y Ch. Siebe. En prensa. Suelos y Geomorfología, en: F. Noguera, R. Ayala y R. N. García-Aldrete (eds). *Historia Natural de Chamela, Instituto de Biología*, UNAM. México.
 21. Dick, R.P. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosys. Environ.* 40: 25-36.
 22. Dick, R.P. 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. En: Doran J. W, Coleman D.C., Bezdicek D. F. y Stewart B. A. (eds.) *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA, Spec Pub. N° 35, Madison. pp. 107-124.
 23. Dick, W. A. y M. A. Tabatabai. 1993. Significance and potencial uses of soil enzymes. P 95-127. In: F. Blaine Metting Jr.(ed). *Soil microbial ecology*. Marcel Dekker. New York. Basel. Hong Kong.
 24. Dinesh, R., Ghoshal Chaudhuri, S. Y; Sheeja, T. E. 2004. Soil biochemical and microbial indices in wet tropical forests: effects of deforestation and cultivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 24-32.
 25. Fawcett, J. K., y J. E. Scott. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13: 156-159.
 26. Galicia, L. 1992. Influencia de la variabilidad de la forma de la pendiente en las propiedades físicas del suelo y su capacidad de retención de agua, en una cuenca tropical estacional. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM, México. D.F.
 27. Galicia L., García-Oliva F., López-Blanco J. 1995. Efecto de la estructura jerárquica del relieve en la distribución de las características físicas de los suelos en una cuenca tropical estacional mexicana. *Boletín de Investigaciones Geográficas* 13: 53-75.

-
-
28. Galicia L., López-Blanco J., Zarco-Arista A.E., Filips V. y García-Oliva F. 1999. The relationship between solar radiation interception and soil water content in a tropical deciduous forest in Mexico. *Catena* 36: 153-164.
 29. García, C., Roldán, A. Y Hernández, T. 2005. Ability of different plant species to promote microbiological processes in semiarid soil. *Geoderma* 124, 193-202.
 30. García, C., Hernández, T. y Costa, F. 1994. Microbial activity in soil under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*
 31. García, C., Hernández, M. T., Costa, F., 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communication in Soil Science and Plant Nutrition* 28: 123-134.
 32. García-Méndez, G., Maass, J. M., Matson, P. A. y Vitousek P. M. 1991. Nitrogen transformations and nitrous oxide flux in tropical deciduous forest in México. *Oecologia* 88: 362-366.
 33. García-Oliva F, Casar I, Morales P, Maass JM. 1994. Forest-to-pasture conversion influences on soil-organic carbon dynamics in a tropical deciduous forest. *Oecologia* 99. 392-396.
 34. García-Oliva, F., y Maass, J. M. 1998. Efecto de la transformación de la selva a pradera sobre la dinámica de los nutrientes en un ecosistema tropical estacional en México. *Bol. Soc. Bot. México* 62: 39-48.
 35. García-Oliva, F., Camou, A. y Maass, J. M. 2002. El clima de la Región Central de la costa del Pacífico Mexicano. In: Noguera F. A., Vega J. H., García-Aldretè A. N. and Quesada M.(eds), *Historia Natural de Chamela*. Instituto de Biología UNAM, México, pp. 3-10.

-
-
36. García-Oliva, F. Garllardo, J. F., Montañó, N. M. y Islas, P. 2006. Soil carbon and nitrogen dynamics followed by a forest-to-pasture conversion in western Mexico. *Agroforestry Systems* 66: 93-100.
 37. García-Oliva, F. Sveshtarova, B y Oliva, M. 2003. Seasonal effects on soil organic carbon dynamics in tropical deciduous forest ecosystem in western Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 19: 179-188.
 38. García-Oliva, F., I Casar, P. Morales y Maass J. M. 1994. Forest-to-pasture conversion influences on soil organic carbon dynamics in a tropical deciduous forest. *Oecologia* 99: 392-396.
 39. García-Oliva, F., R. L. Sanford Jr. Y Kelly E. 1999a. Effect of slash-and-burn management on soil aggregate organic C and N in tropical deciduous forest. *Plant and Soil* 206: 29-36.
 40. García-Oliva, F., R. L. Sanford Jr. Y E. Kelly. 1999b. Effect of burning of tropical deciduous forest soil in Mexico on the microbial degradation of organic matter. *Plant and Soil* 206: 29-36.
 41. Gutiérrez-Alcalá, A. R. 1993. La ganadería extensiva en el trópico seco mexicano: causa, consecuencias y manifestaciones en su medio social. *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Filosofía y Letras, UNAM, México, D.F.
 42. Janzen, D.H. 1988. Tropical dry forest. The most endangered major tropical ecosystem. In: E.O. Wilson (ed.) *Biodiversity*. National Academy Press. U.S.A. pp 130-137.
 43. Jaramillo, V.J., Kauffman, J. B., Rentarí-Rodríguez L., Cummings D.L. y Ellingson L. J. 2003. Biomass, carbon, and nitrogen pools in Mexican tropical dry forest landscapes. *Ecosystems* 6: 609-629.

-
-
44. Jaramillo, V.J y Sanford R.L. 1995. Nutrient cycling in tropical deciduous forests. *In:* S.H. Bullock, H. a: Mooney and E: Medina (eds,) *Seasonally dry tropical forest.* Cambridge University Press. pp 346-361.
 45. Joseph B. Yavitt, S. Joseph Wright y R. Kelman Wieder 2004. Seasonal drought and dry- season irrigation influence leaf-litter nutrients and soil enzymes in a moist, lowland forest in Panama. *Austral Ecology* 29: 177-188.
 46. Lodge, D. J., W. H. McDowell, y McSwiney C. P. 1994. The importance of nutrient pulses in tropical forests. *Tree* 9: 384-387.
 47. Lott E.J. 1985. Listado florístico de México III. La Estación de Biología Chamela Jalisco. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. 47 pp.
 48. Peñuela, M. C. y Drew, P, A, 2004. A model to asses restoration of abandoned pasture in Costa Rica based on soil hydrologic features and forest structure. *Restoration Ecology* (vol 12) 4: 516-524.
 49. Maass, J.M. 1995. Conversion of tropical dry forest to pasture and agriculture. *In:* S.H. Bullock, Mooney y E. Medina (eds) *Seasonally dry tropical forest.* *Cambridge University Press.*
 50. Martínez-Yrizar, A. y J. Sarukhán. 1990. Litterfall patterns in a tropical deciduous forest in Mexico over a five- year period. *Journal of Tropical Ecology* 6: 433-444.
 51. Martínez-Yrizar, A., M. Maass, L.A. Pérez- Jiménez y J. Sarukhán. 1996. Net primary productivity of a tropical deciduous forest ecosystem in western México. *Journal o Tropical Ecology* 12: 169-175.
 52. Mc Donal, M,A. Healey, J,R. 2000. Nutrient cycling in secondary forests in the blue mountains of Jamaica. *Forest Ecology and Management* 139(1-3) 257-278.
 53. McCarty, G.W. Shogren, D.R. Bremner, J.M. 1992. Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 261-264.

-
-
54. McGill, W.B. y Cole, C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and through soil organic matter. *Geoderma* 26: 267-286.
 55. MCGrath, D.A, Smith, C.K Gholz, HL; Oliveira FD 2000. Effects of land-use change on soil nutrient dynamics in Amazonia. *Ecosystem* 4: 625-645.
 56. Miles, L. Newton, A.C. DeFries, R.S., Ravilious, C. May, I., Blyth, S., Kapos, V., y Gordon. J.E. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of biogeography* 33: 491-505.
 57. Murphy, J. and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta* 27: 31-36.
 58. Olander, L.P. y Vitousek, P.M. 2000. Regulation of soil phosphates and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175-190.
 59. Olsen S.R., Cole C.V., Watanabe F.S. y Dean L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circ 939. US gov Print Office, Washington DC
 60. Palacio, Prieto, J., G. Bocco, A. Velásquez, J.E. Mas, E. Takaki, A. Victoria, L. Luna. González, G. Gómez Rodríguez, J. López García, M. Palma, I. Trejo Vázquez, A Peralta, J. Prado Molina, A. Rodríguez Aguilar, R. Mayorga Saucedo y E. González Medrano. 2000. La condición actual de los recursos forestales en México: resultados del Inventario Forestal Nacional 2000 en Investigación Geográficas, Boletín del Instituto de Geogr.-fía UNAM 43, pp. 183-203.
 61. Paul, E.A.S y Clark, F.E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic press San Diego, CA, USA.

-
-
62. Prasad, P. Basu, S y Behera, N.1994. A comparative account of the microbiological characteristics of soil under natural forest, grassland and cropfield from Eastern India. *Plant and Soil* 175: 85-91.
 63. Raghubanshi A.S. 1992. Effect of topography on selected soil properties and nitrogen mineralization in a dry tropical forest. *Soil Biology and Biochemistry* 24:145-150.
 64. Renteria, L.Y. 1997. Biomasa y almacenes de carbono radical en tres comunidades en la costa de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México
 65. Robertson P.G., Coleman, D.C. Bledsoe, C.S. y Sollins, P.1999. Standard soil methods for long-term ecological research (LTER). Oxford University Press.
 66. Roy, S. y Singh, J.S. 1995. Seasonal and spatial dynamics of plant-available N and P pools and N-mineralization in relation to fine roots in a dry tropical forest habitat. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 33-40.
 67. Sarkar, J. M., A. Leonowicz, y J. M. Bollag. 1989. Immobilization of enzymes by clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 21: 223-230.
 68. Saynes V, Hidalgo C., Etchevers J., Campo J. 2005. Soil C and N dynamics in primary and secondary seasonally dry tropical forests in Mexico. *Applied Soil Ecology* 29: 282-289.
 69. SCAF, P. 2000. Geología y geofísica de la costa de Jalisco. En: Noguera F., J. Vega, A. García y M. Quezada. *Historia Natural de Chamela*. Instituto de Biología-UNAM. pp. 11-16.
 70. Schimel, J.P y Bennetti, J. 2004. Nitrogen mineralización: challengens of changing pararigm. *Ecology* 85: 591-602.

-
-
71. Singh, J.S., Raghubanshi, A.S., Singh, R.S. y Srivastava, S.C. 1989. Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. *Nature* 338: 499-500.
 72. Singh, R. S., Srivastava S.C., Raghubanshi, A.S., Singh J.S. y Singh, S.P. 1991. Microbial C, N, and P in dry tropical Savanna: Effects of burning and Grazing. *Journal of Applied Ecology* 28: 869-878.
 73. Singh, S. y J. S. Singh. 1995. Microbial biomass associated with water-stable aggregates in forest, savanna and cropland soils of a seasonally dry tropical region, India. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (8): 1027-1033.
 74. Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., McClaugherty, C.A., 1993. Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology* 74: 1586-1593.
 75. Sinsabaugh, R.L. 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17: 69-74.
 76. Skujins, J., 1973. Dehydrogenase: an indicator of biological activities in arid soils. *Bulletin of Ecological Research Communications (Stockholm)* 17, 235-241.
 77. Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1995. Bometry. 3ra. edición. Freeman and Company, San Francisco, CA, USA.
 78. Srivastava, S y J. Singh 1988. Carbon and phosphorus in the soil biomass of some tropical soils of India. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 743-747.
 79. Srivastava, S. C. y Singh, J. S.. 1991. Microbial C, N and P in dry tropical forest soil: effects of alternative land-uses and nutrient flux. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 117-124.

80. Tabatabai, M. 1994. Methods of soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America, Wisconsin. Book Series, N° 5. *Soil enzymes*. p. 775-833.
81. Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of *p*-nitropheny phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1: 301-307.
82. Technicon industrial System 1977. Technicon industrial meted No. 329-74W/B.
83. Trejo, I. y Dirzo R.. 2000. Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in México. *Biological Conservation* 94: 133-142.
84. UIC 1995. Operation manual of the CM5012 CO2 Colourmeter. UIC Joliet. IL., EUA.
85. von Ende, CN. 1993. Repeated measures analysis: growth and other time-dependent measures. In: Sheiner SM, Gurevitch J, editors. Design and analysis of ecological experiments. New York: Chapman and Hall, p 113-1337.
86. Wick, B., Kühne, R.F., Vlek, P.L.G., 1998. Soil microbiological parameters as indicators of soil quality under improved fallow management systems in south-western Nigeria. *Plant and Soil* 202: 97-107.

ANEXO**(ANEXO 1)****ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA EN SUELO.****Reactivos:**

1. Metanol (grado reactivo)
2. Agua desionizada
3. Solución de INT (2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride) al 0.4 % :Disolver 0.4 g de INT en 99.6 ml de agua desionizada en un matraz aforado de 100 ml. Guardar en refrigerador

Procedimiento:

Pesar tres muestras de 0.1 g de suelo colocándolos dentro de tubos de ensaye de 10 ml con tapa

Humedecer al 60 % de su retención hídrica.

Agregar 0.3 ml de agua y 0.2 ml de INT al 0.4 %

Al control solo se de agrega 0.5 ml de agua

Cerrar los tubos de ensaye e incubar por 22 horas a temperatura ambiente para formar el INTF agitar las muestras.

Centrifugar a 5000 r.p.m por 15 minutos

Tomar el sobrenadante de INTF y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm y comparar la actividad enzimática con base en una curva de calibración que contenga 0, 5, 10, 20, 40, 60, ppm de INTF.

Curva de calibración

Para preparar esta curva:

Se prepara un estándar de 100 ppm de INTF. Disolver 0.005 g de INTF en metanol en un matraz volumétrico de 50 ml.

Tomar una alícuota de 12 ml de la solución estándar de INTF colocarla en un matraz volumétrico de 20 ml, aforando y mezclando bien. De esta misma manera tomar alícuotas de 8, 4, 2, 1 ml de la solución estándar de INTF

Llevar las soluciones a leer en el espectrofotómetro a 490 nm.

Obtener la ecuación de $y = ax + b$ donde $y =$ absorbancia y $x =$ concentración en ppm. Y obtener los coeficientes a y b . Expresar lo resultados en $\mu\text{g de INTF/gh}^{-1}$.

(ANEXO 2)**ACTIVIDAD DE LA UREASA EN SUELO****Reactivos:**

1. Buffer maleico-NaOH 0.02 M. Disolver 24.2 g de TRIS (Hidroximetil) aminomatano (THAM), 23.2 g de ácido maleico, (Solución A). Preparar una solución de 0.2 M NaOH. Disolver 4 g de NaOH en 500 ml de agua desionizada. (Solución B). Para la preparación de este agregar 50 ml de la solución A en 48.8 ml de la solución B aforando en un matraz volumétrico de 200 ml.
2. Solución de urea 0.02 M. Disolver 0.2012 g de urea en 200ml de agua desionizada.
3. Solución de Fenol-Nitroprusido de sodio al 5 % p/v. Disolver 5 g de fenol y 0.025 g de Nitroprusiato de sodio y aforar en un matraz volumétrico de 500ml.
4. Solución de hipoclorito alcalino 0.2 % p/v. Disolver 2.5 g de NaOH, agregando 4.2 ml de hipoclorito de sodios al 42 % aforando con agua en un matraz volumétrico de 500 ml.

Procedimiento:

Pesar tres muestras de 2 g de suelo colocándolos dentro de tubos de ensaye de 10 ml con tapa.

Agregar 2.5 ml de buffer maleico-NaOH 0.02 M pH 6.5 y 2.5 ml de sustrato de urea 0.02 M. Las muestras se dejan 75 minutos a 25 °C (preincubación). Estas muestras se mantienen en agitación durante este tiempo

Se centrifugan para precipitar el suelo y se toman 2 ml de sobrenadante en un nuevo tubo de ensaye

Se agrega 5 ml de Fenol+Nitroprusido de sodio (5% peso /volumen). Se agita manualmente por 30 segundos.

Se Añaden 5 ml de hipoclorito alcalino (0.2% peso/volumen). Agitar nuevamente por 30 minutos de manera manual.

Incubar todas las muestras incluyendo los blancos a 37 °C por 15 min.

Tomar el sobrenadante y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (Estas desarrollan un color azul) y comparar la actividad enzimática con base en una curva de calibración que contenga 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ppm.

Curva de calibración

Para preparar esta curva:

Para calibrar el equipo se utiliza soluciones estándar de sulfato de amonio de 1000 ppm (pesando 0.04767 en 100 ml de agua desionizada; solución A) y de la solución A se toma 20 ml y se aforan a 100 ml solución B) Y de ahí se toma 2, 4, 6, 8, 10, 15, ml de esta solución y cada uno se afora a 100 ml y se lee a 570 nm.

Obtener la ecuación de $y=ax+b$ donde y = absorbancia y x = concentración en ppm. Y obtener los coeficientes a y b . Para poder estos datos se prevé diluciones de las muestras para ajustar a la curva de calibración.

Expresar lo resultados en $\mu\text{g de NH}_4^+ / \text{gh}^{-1}$.

(ANEXO 3)**LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA EN SUELO****Reactivos:**

1. Buffer Universal Modificado (MUB)

MUB. Disolver 12.1 g de TRIS (Hidroximetil) aminometano, 11.6 g de Ácido meléico, 14 g de ácido cítrico y 6.3 g de ácido bórico en 488 ml de NaOH 1 N y diluir la solución a 1L con agua desionizada. Refrigerar solución stock. Para fosfatasa ácido el buffer se debe de ajustar a un pH de 6.5 y para fosfatasa alcalina a un pH 11, tomando 200 ml de la solución stock en un matraz volumétrico de 500 ml. Introduciendo una barra magnética y colocar en un agitador magnético, e introduciendo la barra del potenciómetro llevar la solución stock a pH 6.5 o 11 con HCL 0.1 N o NaOH 0.1 N respectivamente y aforar con la misma solución verificando que no haya cambio en el pH.

2. Solución de *p*-nitrofenil fosfato 0.115 M.

Disolver 10.67 g de Sal disódica de *p*-Nitrofenil fosfato hexahidratado en 150 ml de solución stock en un matraz volumétrico de 250 ml y agitar hasta disolver en el agitador magnético y aforar con la solución stock al pH 6.5 o 11. Guardar en refrigeración

3. Cloruro de calcio 0.5 M.

Disolver 22.19 g de CaCl₂ en cerca de 300 ml de agua desionizada colocándolo en el agitador magnético y diluir a un volumen de 400 ml con agua. Guardar en refrigeración.

4. Hidróxido de sodio 0.5 M

Disolver 20 g de NaOH en cerca de 200 ml de agua dentro de un matraz volumétrico de 1 L colocándolo en el agitador magnético y aforar al un 1 L de agua desionizada y refrigerar a la solución.

5. Solución estándar de *p*-nitrofenol (PNF).

Disolver 0.0025 g de PNF en 100 ml de agua desionizada y preparar patrones.

Procedimiento:

Pesar tres muestras de 0.1 g de suelo colocándolos dentro de tubos de ensayo de 10 ml con tapa.

Agregar 2 ml de buffer universal modificado 0.1 M pH 6.5 y 0.5 ml de sustrato de *p*-nitrofenol fosfato 0.115 M.

Incubar todas las muestras incluyendo los blancos a 37 °C por 1 hora. Después de la incubación se enfrían a 4 °C por 15 min.

Agregar 0.5 ml del sustrato *p*-Nitrofenil fosfato 0.115 M a los tubos control

Agregar a todas las neutras y al control 0.5 ml de CaCl₂ 0.5 M y 2 ml de NaOH 0.5 M agitar de manera manual por 1 min.

Centrifugar a 3500 r.p.m por 10 minutos para precipitar el suelo

Tomar el sobrenadante y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 398 nm (Estas desarrollan un color amarillo) y comparar la actividad enzimática con base en una curva de calibración que contenga 20, 15, 10, 5, 2.5, 0 ppm.

Curva de calibración.

Para preparar esta curva:

Se prepara un estándar de 20 ppm de *p*-nitrofenol. Disolver 0.0025 g de *p*-nitrofenol y disolver en 100 ml de agua desionizada.

Tomar una alícuota de 8, 6, 4, 2, 1, 0 ml de la solución estándar de *p*-nitrofenol colocarla en un matraz volumétrico de 10 ml, aforando con agua desionizada mezclando bien. De esta forma tenemos las concentraciones de 20, 15, 10, 5, 2.5, y 0 ppm respectivamente.

Llevar las soluciones a leer en el espectrofotómetro a 398 nm.

Obtener la ecuación de $y=ax+b$ donde Y= absorbancia x y x concentración en ppm. Y obtener los coeficientes a y b.

Expresar lo resultados en $\mu\text{g de } p\text{-NF/gh}^{-1}$