

**EFFECTO DE UN INCENDIO FORESTAL SOBRE LA MICROBIOTA DE UN SUELO
DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA**

LIZETH CAROLINA OSPINA CÉSPEDES

**Trabajo de grado como requisito para optar al título de
Biólogo**

Directora

MARYEIMY VARÓN LÓPEZ

Doctora en Ciencias

Coodirectora

MARIBEB CASTRO GONZÁLEZ

Doctora en Oceanografía

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA

IBAGUÉ-TOLIMA

2017



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO EFECTO DE UN INCENDIO FORESTAL SOBRE LA MICROBIOTA DE UN SUELO DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

AUTORES Lizeth Carolina Ospina Cespedes (070100402011)

DIRECTOR Maryeimy Varón López

CO-DIRECTOR Maribeb Castro González

JURADOS: Sandra Patricia Montenegro Gómez (UNAD) y Andrés Felipe Vanegas Salive (ECOFARM)

CALIFICACIÓN (4.9) Cuatro punto nueve

APROBADO

REPROBADO

OBSERVACIONES _____

FIRMAS

Sandra P. Montenegro

JURADO 1.

Director del trabajo

Andrés Felipe Vanegas S.

JURADO 2.

Director del Programa

Ciudad y fecha:

Ibagué, 7 sep 2017

DEDICATORIA

*A mis padres, Argelia y Jairo
y mis hermanos, Julian y Vivian;
por su apoyo continuo e incondicional.*

“Cuenta una antigua leyenda que Bodhidharma (Daruma), un monje budista del siglo VI, se sentó frente a una pared, dentro de una cueva para meditar por un período de nueve años sin moverse, esto provocó la pérdida de sus piernas y brazos por atrofia”. El muñeco de los propósitos o Daruma simboliza la perseverancia, el esfuerzo y la consecución del objetivo impuesto, la habilidad para el éxito y para superar las adversidades.



AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos:

A los miembros del grupo de investigación GEBIUT de la Universidad del Tolima, en especial a la doctora Maryeimy Varón por su constante acompañamiento y colaboración en cada uno de los aspectos que permitieron la realización de este trabajo, además de los conocimientos impartidos; y a los estudiantes Julieth Vargas, Yessica Perdomo y Herik Guzmán por su gentil ayuda y amistad.

A la doctora Maribeb Castro, por su orientación, sugerencias y permanente asesoría desde el inicio hasta la culminación de este proyecto.

Al laboratorio de microbiología del suelo de la Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ); a Fernando Dini Andreote, Armando Dias, Alessandra Rigotto, Denise Mescolotti y demás integrantes del laboratorio por bríndame su ayuda y conocimientos.

A Raúl Polanco, por permitirnos llevar a cabo este estudio en la reserva Santafé de los Guadales.

Y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron con la realización de este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVOS	13
1.1 OBJETIVO GENERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 INCENDIOS FORESTALES	14
2.1.1 Impactos y efectos de los incendios forestales.....	15
2.2 EL SUELO	17
2.2.1 Propiedades del suelo	17
2.3 MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO EN EL ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS EDÁFICOS	21
2.4 MICROORGANISMOS COMO BIOINDICADORES EDÁFICOS	22
3. METODOLOGÍA	24
3.1 ÁREA DE ESTUDIO	24
3.2 MUESTREO DEL SUELO	25
3.3 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	26
3.3.1 Biomasa-C y actividad microbiana.....	26
3.3.2 Densidad total y de los grupos funcionales	27
3.3.3 Técnicas independientes de cultivo	28
3.4 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS DEL SUELO	30
3.5 ÍNDICE DE MINERALIZACIÓN	30
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32

5. CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa del área de estudio. Ubicación de la reserva Santafé de los Guadales en imagen satelital del casco urbano de Ibagué	24
Figura 2. Registro fotográfico del área de estudio. a. área control; b. área afectada por el incendio; c. acercamiento del área afectada por el incendio	25
Figura 3. Esquema de la metodología de colecta de las muestras de suelo.....	26
Figura 4. Perfil de bandas de bacterias en los ambientes estudiados a. gel de DGGE b. diagrama del perfil de bandas (las flechas hacia la izquierda (\leftarrow) representan las bandas que solo se encuentran en Q y hacia la derecha (\rightarrow) se señalan las bandas exclusivas de C).....	38
Figura 5. Diagrama de análisis de coordenadas principales de bacterias en los ambientes evaluados, a partir de los datos de DGGE. (Q1 a Q5: son los puntos del suelo Q, al igual C1 a C5 son los puntos del suelo C).....	39
Figura 6. Perfil de bandas de BOA en los ambientes evaluados a. gel de DGGE b. diagrama del perfil de bandas (Las flechas hacia la izquierda (\leftarrow) representan las bandas que solo se encuentran en Q y hacia la derecha (\rightarrow) se señalan las bandas exclusivas de C).....	40
Figura 7. Diagrama de análisis de coordenadas principales de BOA en los ambientes evaluados, a partir de datos del DGGE. (Q1 a Q5: son los puntos del suelo Q, al igual C1 a C5 son los puntos del suelo C).....	41
Figura 8. Comparación del porcentaje del índice de mineralización en los ambientes evaluados.....	44
Figura 9. Análisis de componentes principales de la relación entre los parámetros fisicoquímicos y los atributos microbiológicos, referentes a la actividad microbiana (Fd: Fósforo disponible; pH; Imi: índice de mineralización; Fac: fosfatasa acida; Fal: fosfatasa alcalina; RB: respiración basal; RI: respiración inducida; DESH: deshidrogenasa; BIO: biomasa; CO: carbono orgánico; NIT: nitrógeno; AMO: amonio y Hed: humedad edáfica).	45

Figura 10. Análisis de componentes principales de la relación entre los parámetros fisicoquímicos y los parámetros microbiológicos, referentes a la densidad microbiana (pH; F. DIS: Fósforo disponible; Hon: hongos; Amf: amonificantes; Hed: humedad edáfica; Cel: celulolíticos; CO: carbono orgánico; Bac: bacterias; NIT: nitrógeno; Sf: solubilizadores de fosfato; Amo: amonio y qPCR: densidad de bacterias medida en qPCR).46

RESUMEN

En Colombia los incendios forestales contribuyen a la degradación de los bosques, uno de los más afectados es el bosque seco tropical (BST). Dado que los microorganismos son componentes fundamentales del suelo, son empleados como bio-indicadores pues reflejan los cambios en éste. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un incendio forestal sobre la microbiota de un suelo de BST en la reserva Santafé de los Guadales. Se evaluaron dos áreas, una quemada (Q) y una control (C). Se estimó la actividad (biomasa-C, respiración y actividad enzimática), la abundancia (total y de los grupos funcionales mediante medios selectivos, la abundancia de bacterias también se evaluó por qPCR) y la estructura de la comunidad microbiana (bacterias y oxidantes de amonio con la técnica de DGGE); además, se determinaron los parámetros fisicoquímicos de: pH, humedad edáfica, carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo disponible y amonio. La mayoría de los valores en los parámetros analizados disminuyeron en el área afectada por el incendio; siendo el nitrógeno (-56%) y el carbono orgánico (-43%) los que más se vieron afectados de los parámetros fisicoquímicos, y de los parámetros microbiológicos, la estructura de la comunidad bacteriana y la densidad de los grupos funcionales fueron los más sensibles ante la quema. Se concluye que el incendio afectó de forma negativa el ambiente edáfico del BST estudiado, además, teniendo en cuenta la relación observada entre algunos parámetros se sugiere que la comunidad microbiana también responde de forma sensible a la cantidad y calidad del sustrato disponible.

Palabras clave: bioindicadores, parámetros microbiológicos, comunidad microbiana, quema, amonificantes.

ABSTRACT

Forest fires contributed to the degradation of woodlands in Colombia, one of the most affected is the dry tropical forest. Since microorganisms are fundamental components of the soil, they are used as biological indicators because they reflect alterations in the soils. The main goal of this study was to evaluate the effect of a forest fire in the microbiota on dry tropical forest soils in the Santafé de los Guadales reserve. Two areas were evaluated, one of them was burned (Q) and the other one was used as a control (C). The activity (biomass-C, respiratory and enzymatic activity), the abundance (total and functional groups by selective mediums, abundance of bacteria was also assessed by qPCR) and the microbial community structure (bacteria and ammonium oxidizing bacteria with the DGGE technique) were determined; besides physicochemical parameters, pH, soil moisture, organic carbon, total nitrogen, available phosphorus and ammonium were determined too. Most of the values in the analyzed parameters decreased in the area affected by fire; being the nitrogen (-56%) and organic carbon (-43%) the most affected of the physicochemical parameters and of the microbiological parameters, the bacterial community structure and the functional groups density were the ones that showed greater sensitivity by burning. We concluded that fires affects in negative way the edaphic environment of the dry tropical forest studied, moreover, considering the relation found between some parameters, we suggest that microbial community responds too in a sensitive way to the quantity and quality of the available substratum.

Keywords: bioindicators, microbiological parameters, microbial communities, burning, ammonifiers.

INTRODUCCIÓN

En Colombia los incendios forestales son una problemática constante que se intensifica durante los periodos secos prolongados y están asociados al fenómeno del niño. Estos generan problemas económicos, sociales y ambientales, y han contribuido a la degradación de los ecosistemas boscosos del país, pues cada año afectan un promedio de 70,000 hectáreas. La causa de los mismos, en su mayoría es de origen antrópica, debido a la idea generalizada de usar el fuego para la preparación del suelo para cultivos agrícolas y pastos para ganadería (Minambiente, 2011; Mondragón, Melo y Gelvez, 2013). Uno de los periodos secos más recientes y de gran impacto, se dio durante la segunda temporada seca del año 2015, a nivel nacional ocurrieron diferentes conflagraciones (EL TIEMPO, 2015) y el Tolima fue una de las regiones más afectadas, se presentaron 2.198 incendios que consumieron al menos 24.600 Ha (EL ESPECTADORb, 2015).

La alta diversidad biológica, la sostenibilidad de los recursos agua y suelo, así como algunas actividades humanas se ven afectadas en Colombia de forma notoria por los incendios (IDEAM, 2014); estos pueden cambiar significativamente las propiedades del suelo, afectan el crecimiento de las plantas, impactan la dinámica de los ciclos biogeoquímicos y la productividad de los bosques (Nave, Vance, Swanston y Curtis, 2011; Vega et al., 2013).

Uno de los ecosistemas más afectados por este tipo de eventos, es el bosque seco tropical (BST), el cual presenta alta vulnerabilidad a la ocurrencia de incendios. En la actualidad, el BST es considerado uno de los más amenazados del mundo ya que se encuentra altamente fragmentado y es propenso a la desertificación (Janzen, 1988). En Colombia, cerca del 95% de las áreas en que se distribuía el BST son ahora dedicadas a la ganadería, agricultura y fincas de recreo (Pizano y García, 2014).

Debido a que los microorganismos son componentes fundamentales del suelo, pueden emplearse como indicadores de cambios causados por perturbaciones ambientales (Fontúrbel et al., 2012). Dentro de la microbiota, los grupos funcionales (grupo de microorganismos que participan de una misma etapa en los ciclos biogeoquímicos) reflejan mejor que la comunidad microbiana total las alteraciones en los suelos, por lo que su uso es óptimo para evaluar disturbios (Abril, 2003). Sin embargo, ya que se estima que solo valores entre el 0,1% y 10% de las comunidades microbianas pueden ser cultivados por métodos tradicionales (Durrer y Andreote, 2016), métodos independientes de cultivo como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE), cada día toman más importancia, pues son un excelente complemento y soportan con mayor precisión los cambios en la comunidades microbianas totales y funcionales.

En Colombia, la mayoría de estudios que usan a los grupos funcionales de microorganismos edáficos como indicadores, se relacionan directamente con sistemas productivos, tales como investigaciones que evalúan el efecto del uso de suelo (Ortiz - Moreno, 2010; Avellaneda-Torres, 2014) y el efecto de los agroquímicos (Chaves-Bedoya, Ortiz-Moreno y Ortiz-Rojas, 2013; Martínez-Nieto, Correa-Torres, Robles-Camargo y Valderrama-Barco, 2014), en menor medida, se ha usado a los grupos funcionales de microorganismos, como indicadores de disturbios ecológicos, tales como los incendios (Albornoz y Tusso, 2010; Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013); estos se han hecho en ecosistemas de páramo y de alta montaña.

Ya que en Colombia no existen registros de estudios de este tipo en el BST y dada la vulnerabilidad de este ecosistema a los incendios, es necesario establecer cuál es el efecto de un incendio forestal sobre las propiedades fisicoquímicas, la abundancia y actividad de la microbiota edáfica.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un incendio forestal, sobre la abundancia, actividad y diversidad de la comunidad microbiana de un suelo de BST en la reserva Santafé de los Guaduales, Ibagué-Tolima.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la biomasa-C y la actividad microbiana (respiratoria y enzimática) en el suelo del BST de la reserva Santafé de los Guaduales después de un incendio forestal.
- Estimar la densidad de bacterias, hongos y grupos funcionales: solubilizadores de fosfato, celulolíticos y amonificantes.
- Comparar la estructura de la comunidad de bacterias totales y bacterias oxidantes de amonio mediante la técnica DGGE.
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos del suelo en la reserva Santafé de los Guaduales, Ibagué-Tolima.
- Relacionar los parámetros biológicos y fisicoquímicos en un suelo de BST después de un incendio forestal.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. INCENDIOS FORESTALES

Los incendios forestales han sido un disturbio natural presente en la mayoría de ecosistemas boscosos, son sucesos que ocurren desde antes de la existencia de la especie humana, sin embargo durante el Neolítico, cuando algunas comunidades adoptaron actividades como la agricultura, el fuego se constituyó en una herramienta de la humanidad; aunque en muchos ecosistemas los incendios son un factor natural y ecológico, en la actualidad, se ha convertido en un factor de origen antrópico en la mayoría de las veces (Mataix-Solera y Guerrero, 2007; Mataix-Solera, Cerdà, Arcenegui, Jordán y Zavala, 2011).

A nivel mundial los incendios forestales son cada año más frecuentes e intensos, dañan los ecosistemas y afectan al hombre. Las zonas húmedas tropicales, son el lugar donde más se detectan, ya que características como, clima cálido y periodos de sequía que se pueden prolongar, favorecen el aumento del número e intensidad de incendios; cabe destacar que, bajo el escenario de cambio climático, se consideran un problema mundial que requiere más atención entre los científicos (Mataix-Solera y Cerdá, 2009; Mondragón et al., 2013).

La presencia de incendios forestales en Colombia ha sido recurrente cada año, se deben principalmente a factores antrópicos; las quemas agrícolas casi siempre conllevan un alto riesgo de propiciar incendios, en razón de las escasas medidas preventivas, adoptadas por los usuarios de la tierra, las quemas que escapan al control consumen coberturas no destinadas a arder y afectan especialmente a los bosques nativos y plantados (IDEAM, 2014).

Durante la segunda temporada seca del 2015 se presentaron varios incendios forestales, los cuales arrasaron con 92.000 hectáreas de bosques y cultivos (EL TIEMPO, 2015);

uno de los departamentos más afectadas fue el Tolima en el que por cuenta de la ola de calor que se registró, se presentaron incendios forestales en aproximadamente el 60% de los municipios (EL ESPECTADORb, 2015). Además, según la Gobernación del Tolima, al menos 24.600 hectáreas fueron arrasadas por las llamas en 2.198 incendios (EL ESPECTADORb, 2015) y en Ibagué el panorama no fue diferente, pues el IDEAM reveló que la capital de Tolima registro uno de los mayores incrementos en temperaturas promedio del país, presentando en Agosto cuatro grados centígrados por encima del promedio normal, esta ola de calor favoreció la propagación de incendios forestales, que llegaron a afectar zonas de conservación como la reserva Santafé de los Guadales (EL ESPECTADORA, 2015).

2.1.1. Impactos y efectos de los incendios forestales: Los Incendios forestales generan una serie de impactos económicos, sociales y ambientales.

Los impactos económicos son tanto al sector público como al privado, según el Minambiente (2011) el país incurrió en un gasto de \$ 24.475.073.672, en los tres primeros meses del año 2010 tan solo en el control y extinción de incendios por parte de las entidades operativas (no se tuvo en cuenta el valor por daños, a la propiedad privada y a los ecosistemas ya que es una tarea compleja y de investigación precisa).

A nivel social los incendios forestales, pueden afectar de forma negativa la economía campesina al generar daños en inmuebles o cultivos; además, las perturbaciones en áreas de conservación como bosques, generan daños en estos que repercuten en los bienes y servicios que les presta a las comunidades.

Y a nivel ambiental se reconocen diferentes impactos, en la biodiversidad y en los recursos agua y suelo, estos dependen de factores como: la intensidad del disturbio y las características de la zona.

La biodiversidad, es fuertemente afectada ya que los incendios forestales consumen la vegetación que compone cada ecosistema, lo que causa la pérdida de recursos

genéticos y hábitats; en Colombia los ecosistemas de páramo y de bosque seco, presentan alta vulnerabilidad y amenaza debido a sus condiciones naturales y a la presión antrópica que se ejerce en ellos (Minambiente, 2011). En la mayoría de las ocasiones los espacios afectados no se recuperan.

De igual forma el ciclo hidrológico se ve afectado, no solo en cantidad sino en calidad por la contaminación generada en la combustión (Minambiente, 2011); esto se debe a la alteración de la infiltración y la escorrentía superficial, provocada por la eliminación de la cubierta vegetal tras los incendios forestales, además éstos ocasionan cambios en determinadas propiedades fisicoquímicas del suelo, que contribuye a la alteración del mismo en la zona afectada, principalmente por la formación de sustancias hidrofóbicas (Mataix-Solera y Guerrero, 2007).

En el caso del suelo, éste puede sufrir cambios directos producidos por el calentamiento en sus propiedades físicas, químicas y biológicas y cambios indirectos como consecuencia de la nueva situación microclimática después de la pérdida de la cubierta vegetal; esas alteraciones, pueden retrasar el crecimiento de una nueva cubierta vegetal y por tanto exponer durante más tiempo al suelo frente a agentes erosivos (Mataix-Solera y Guerrero, 2007).

En ocasiones, tras un incendio puede haber un aumento de la fertilidad, debido a la disponibilidad de algunos nutrientes fundamentales como el fósforo, el magnesio o el calcio, y parcialmente el potasio, devueltos por las cenizas; sin embargo, éste suele ser efímero, pues posterior a los periodos secos que favorecieron estos disturbios le sigue los periodos de lluvia, que pueden causar la pérdida de nutrientes por lavado (lixiviación) (Mataix-Solera y Guerrero, 2007).

A manera general podemos decir que los efectos más comunes son: 1. La pérdida de materia orgánica y nutrientes por volatilización, lixiviación y erosión; 2. Alteraciones cuantitativas y cualitativas de las comunidades microbianas; y 3. Deterioro de la estructura edáfica (Mataix-Solera y Cerdà, 2009).

En cuanto a la microbiocenosis los efectos dependen mucho de la intensidad del incendio, en casos extremos la capa superficial del suelo puede someterse a completa esterilización; muchos autores han encontrado un efecto negativo en los microorganismos, algunos grupos de microorganismos son considerados más sensibles al calor que otros, por ejemplo, en comparación a las bacterias los hongos parecen ser los más afectados (Bárcenas-Moreno, García-Orenes, Mataix-Solera, Mataix-Beneyto y Bååth, 2011; Mataix-Solera y Guerrero, 2007; Mataix-Solera et al., 2011). Además, la microbiota del suelo puede verse afectada tanto en abundancia, como en diversidad y actividad (Mataix-Solera, Guerrero, García-Orenes, Bárcenas y Torres, 2009).

Finalmente, los incendios forestales pueden alterar la producción de gases de efecto invernadero como N_2O o CO_2 , que contribuyen al cambio climático, el cual se constituye en una gran amenaza para el planeta (Docherty, Balsler, Bohannan y Gutknecht, 2012). Un estudio realizado por Niboyet et al., (2011) mostró que tras un incendio las emisiones de N_2O se incrementaron de forma tal, que al cabo de tres años las emisiones duplicaban los valores en el suelo afectado.

2.2. EL SUELO

El termino “suelo” cuenta con diferentes significados que dependen del campo del cual se aborde; desde la biología, es un hábitat fascinante lleno de vida, es un sistema heterogéneo, discontinuo y estructurado, formado por microhábitats discretos con diferentes características químicas, físicas y comunidades biológicas. Estas características son altamente interdependientes, de modo que no se puede modificar ninguna de ellas sin afectar las demás (Moreira y Siqueira, 2006; Vella, Navracsics, Larigauderie y Wall, 2015).

2.2.1. Propiedades del suelo: Una propiedad fisicoquímica o biológica del suelo es aquélla que caracteriza al suelo; estas propiedades varían según las condiciones climáticas, composición del suelo y según el manejo que el ser humano le dé al suelo (Arias, 2007).

Las propiedades fisicoquímicas del suelo son las que dependen de la estructura (forma, tamaño, porosidad, etc.) y composición química del suelo (minerales, humus entre otros). Algunas de las propiedades más usadas en diferentes estudios son: pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, textura, porosidad, humedad edáfica, fósforo, nitrógeno y carbono orgánico; debido a que a través de métodos sencillos y económicos se pueden estimar estos parámetros y conocer el estado de un área en particular.

Por otro lado, las propiedades biológicas están asociadas a la presencia de materia orgánica y a las formas de vida presentes en el suelo; se define como materia orgánica, todo desecho de organismos vivientes que se encuentran en el suelo en diferentes etapas de descomposición. La materia orgánica está compuesta principalmente por lignina, carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos libres, grasas, ceras y resinas; también están presentes otros componentes como vitaminas, hormonas, ácidos orgánicos, quelatos, etcétera (Arias, 2007).

En cuanto a la vida en el suelo, ésta es principalmente gobernada por la fauna (animales) y los microorganismos; los microorganismos son seres microscópicos, ellos existen en poblaciones extremadamente grandes, en una cuchara de té de tierra se puede encontrar entre cien y doscientos millones de microbios (Arias 2007).

Las propiedades biológicas del suelo han permitido el establecimiento de diferentes parámetros biológicos, que han mostrado ser más sensibles que los parámetros fisicoquímicos, ya que permiten evidenciar cambios en menor tiempo, por lo tanto han tomado relevancia como bioindicadores, su respuesta se debe principalmente a que los microorganismos cumplen diversos tipos de actividades y por lo tanto influyen el ambiente edáfico, así como también responden a los cambios que se den en este (Abril, 2003; Moreira y Siqueira, 2006). Existen diferentes métodos de estudio para abordar los parámetros biológicos, algunos de estos son:

- La biomasa microbiana, que se define como la parte viva de la materia orgánica, constituida por bacterias, hongos, arqueas, protozoos y representantes del reino animal, como los nemátodos (Vieira, 2016). Pese que representa una pequeña parte del carbono orgánico del suelo, es un indicador sensible de cambios en los ecosistemas, ya que es extremadamente influenciada por los factores que afectan la densidad y la actividad de los organismos del suelo, en especial, por la disponibilidad de C y nutrientes (N, P y S), humedad, aireación, pH y textura del suelo (Moreira y Siqueira, 2006).
- La actividad microbiana, que compromete todas las reacciones bioquímicas catalizadas por microorganismos en el suelo, puede ser dividida en dos tipos: general y específica. La actividad general es aquella proveniente de casi todos los microorganismos del suelo, como la respiración y la actividad de algunas enzimas como la deshidrogenasa, presentando, por tanto, un valor significativo como índice de actividad total del suelo. La respiración, se puede cuantificar con la medida de CO₂ producido; ésta puede ser basal (con la materia orgánica preexistente) o inducida (por un sustrato, adicionándose una fuente orgánica específica, ej., glucosa) (Alef, 1995; Moreira y Siqueira, 2006). Y la específica es realizada por grupos determinados como los amonificantes, solubilizadores de fosfato, entre otros, por ejemplo, el evaluar las enzimas fosfatasa permite tener una visión de la dinámica del fósforo en el suelo (Moreira y Siqueira, 2006).
- La densidad microbiana, es la cuantificación de los microorganismos por gramo de suelo, es una de las medidas más empleadas, ya que en el suelo se encuentran millones de ellos, los cuales participan de la génesis del hábitat donde viven. Este parámetro se puede cuantificar por métodos convencionales como conteo en placa y número más probable, de esta forma se puede realizar un conteo de hongos actinobacterias y bacterias que dan como resultado una visión general de la microbiota edáfica o también se pueden evaluar grupos funcionales específicos que intervienen de forma activa en los ciclos biogeoquímicos (Moreira y Siqueira, 2006; Arias, 2007).

Se ha establecido que los grupos funcionales de microorganismos son aquellos que participan en la transformación bioquímica de compuestos orgánicos e inorgánicos en el ambiente, también son los directos ejecutores de la mayoría de las etapas de los ciclos biogeoquímicos (C, N y P), de esta forma promueven el reciclaje de la materia orgánica y de los diferentes elementos para que se encuentren disponibles y así ser usados una y otra vez por otros organismos (Moreira y Siqueira, 2006; Perez, 2008). A continuación, se presentan algunos de los grupos funcionales de microorganismos más usados para evaluar la calidad de los suelos:

- Solubilizadores de fosfato: Son aquellos microorganismos capaces de extraer o solubilizar fósforo (P) de fracciones insolubles en el suelo y fosfatos inorgánicos naturales poco solubles (Moreira y Siqueira, 2006). El P del suelo, puede ser liberado de los compuestos orgánicos a través de tres grupos de enzimas: fosfatasas no específicas (fosfomonoesterasas), fitasas y fosfonatasas y liasas (Patiño, 2010).
- Celulolíticos: Son los microorganismos que se caracterizan por la habilidad de descomponer celulosa, la utilizan como fuente de carbono y energía. La degradación de la celulosa en el suelo ocurre por la acción de las enzimas (celulasas) producidas por una vasta y diversa población fúngica, principalmente representantes de los géneros *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Phoma* y bacterias aerobias y anaerobias. (Moreira y Siqueira, 2006).
- Amonificantes: Son aquellos microorganismos que convierten el nitrógeno de los restos orgánicos en amoníaco (NH₃) y amonio (NH₄) y hacen posible el intercambio de nitrógeno entre el suelo y los seres vivos, sin necesidad de una continua fijación de nitrógeno atmosférico (Campos-Bedolla et al., 2003).

- Nitrificantes: Son aquellos microorganismos capaces de oxidar el amonio para formar nitrito y nitrato, esta oxidación, conocida como nitrificación, proporciona energía para la supervivencia y proliferación de los microorganismos. Tradicionalmente se había indicado que las bacterias del género *Nitrosomonas* eran las más importantes para la oxidación de amonio a nitrito, y las bacterias del género *Nitrobacter* para oxidar el nitrito a nitrato; sin embargo, en estudios recientes se señala que la actividad de oxidación del amonio puede ser llevado a cabo en mayor proporción por arqueas que por bacterias (Shen, Zhang, Di y He, 2012).

2.3. MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO EN EL ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS EDÁFICOS

La alta diversidad microbiana presente en el suelo y las distintas condiciones que requieren los diferentes organismos, hacen suponer que solo una minoría puede ser fácilmente cultivada en el laboratorio; en este sentido, la aplicación de las técnicas llamadas independientes de cultivo, basadas en la detección y análisis de la diversidad de ácidos nucleicos (DNA o RNA), permiten un análisis más fiel de la estructura, composición y función de las comunidades microbianas (Silva, 2012; Durrer y Andreote, 2016).

En la última década un gran número de métodos han sido desarrollados con el fin de estudiar genes funcionales en muestras ambientales; muchas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction – PCR) y emplean iniciadores específicos para genes de interés, en cuanto a genes funcionales, se destaca el uso de los genes relacionados a las etapas específicas dentro de los ciclos biogeoquímicos, los genes que más se han usado son aquellos relacionados al ciclo del nitrógeno (*nifH*, *amoA*, *nirK*, *nosZ*). Otras técnicas evalúan el perfil de la comunidad, dentro de esas están el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción terminal (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – TRFLP) y la electroforesis en gel de gradiente denaturante o DGGE; ambas separan fragmentos de DNA de acuerdo a las

características de su secuencia y son eficientes para mostrar variabilidad dentro de la comunidad y hacer comparaciones entre muestras (Silva, 2012).

Los grupos funcionales específicos también pueden ser monitoreados y cuantificados por medio de técnicas como la PCR cuantitativa (qPCR), la cual combina la enorme sensibilidad de la técnica de PCR con la precisión que asegura el monitoreo “in situ” de los productos generados por esta reacción a través del tiempo; permite detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos (Rodríguez y Rodríguez, 2006; Silva, 2012).

2.4. MICROORGANISMOS COMO BIOINDICADORES EDÁFICOS

Los microorganismos son componentes fundamentales del suelo, por lo cual, reflejan los cambios en el ambiente edáfico provocados por disturbios, se han empleado para evaluar su respuesta ante diferentes prácticas antrópicas a nivel mundial (Moscatelli, Lagomarsino, Marinari, Angelis y Grego, 2005; Mataix-Solera et al., 2009; Ortiz-Moreno, 2010; Varón-López, 2010; Silva, 2012). Ha sido establecido que los grupos funcionales evidencian mejor que los grupos taxonómicos los cambios en el ambiente, ya que microorganismos de un mismo grupo filogenético pueden mostrar variadas respuestas fisiológicas ante un factor estresante, además a nivel de grupos funcionales también es posible inferir el efecto en la dinámica de los ciclos biogeoquímicos (Docherty et al., 2012).

Es por esto que diferentes autores han usado los grupos funcionales de microorganismos como bioindicadores (Cañón-Cortázar, Avellaneda-Torres y Torres-Rojas, 2012; Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013; Vieira, 2016), la mayoría a través de métodos convencionales, sin embargo en las últimas décadas los métodos independientes de cultivo han sido incluidos en este tipo de estudios; técnicas como el DGGE son una excelente herramienta para la investigación y comparación de comunidades a nivel funcional, se ha usado para evaluar la diversidad de algunos grupos funcionales en un amplio rango de ambientes y también para conocer cómo cambian las comunidades ante variaciones

ambientales (Nicolaisen y Ramsing, 2002; Throback, Enwall, Jarvis y Hallin, 2004; Verhamme, Prosser y Nicol, 2011).

En el caso de los incendios forestales, los estudios de grupos funcionales de microorganismos en suelos perturbados por incendios, muestran que éstos son indicadores valiosos; se ha encontrado que el grupo celulolíticos es sensible a cambios producidos inmediatamente después de un disturbio intenso (Fluctuaciones entre -50% a +49%), sin embargo, pasado cierto tiempo este grupo se recupera de tal forma que su densidad es equiparable a una zona que no haya sido afectada (Abril, 2003; Albornoz y Tusso, 2010; Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013). Por otro lado, los grupos amonificantes y solubilizadores de fósforo han mostrado una recuperación más lenta, pues sus poblaciones se ven disminuidas transcurrido el tiempo (Sáenz, 2006; Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013).

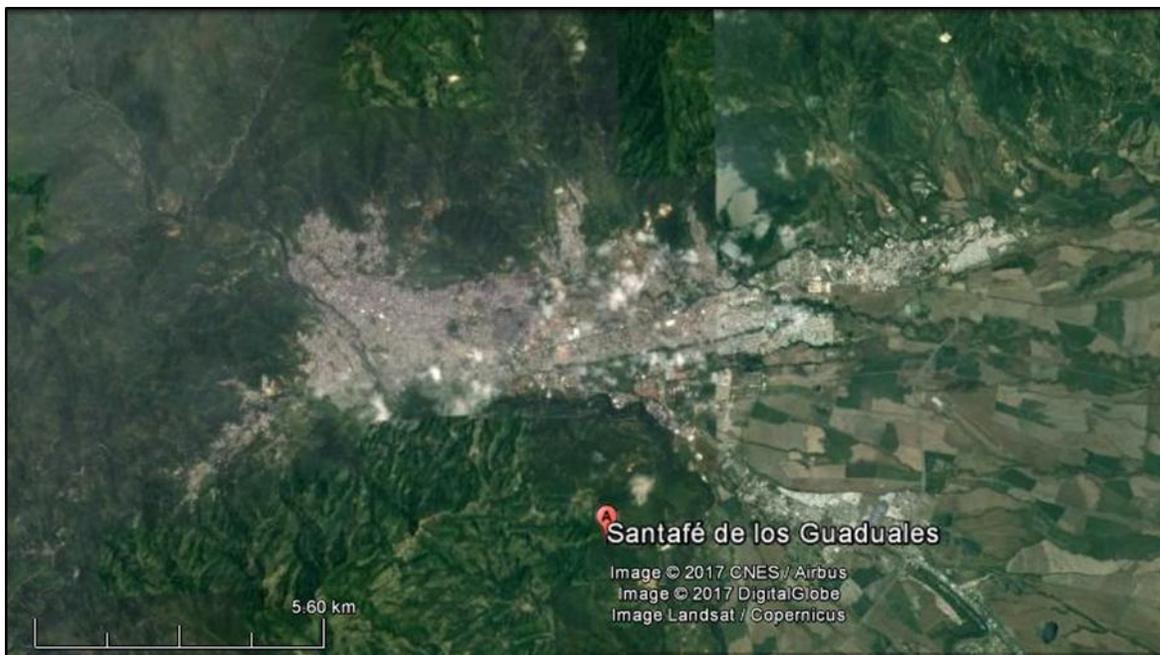
En Colombia, y específicamente en el departamento del Tolima, el estudio de los microorganismos como bioindicadores de la calidad y cambio en el uso del suelo, han estado enfocados principalmente a evaluar los sistemas agrícolas (Lagos, Campos y Fuentes, 2005; Cañón-Cortázar et al., 2012). En el caso particular de los incendios, solo se han realizado evaluaciones en zonas de páramo y de alta montaña (Albornoz y Tusso, 2010; Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013), pero para el Tolima, pese a ser uno de los departamentos más afectados periódicamente por este tipo de eventos, no se habían evaluado estas comunidades microbianas, hasta ahora a través de esta investigación, la cual se constituye en un reporte base para la región.

3. METODOLOGÍA

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

El sitio de estudio es un ecosistema de Bosque Seco Tropical (BST), ubicado en la reserva Santafé de los Guaduales, la cual se encuentra a $4^{\circ} 24' 17.84''$ latitud norte y $75^{\circ} 11' 46.02''$ longitud oeste, en la vereda potrerito, cerca al casco urbano del municipio de Ibagué-Tolima (Figura 1) a una altitud media de 1.090 msnm; tiene una superficie de 49 Ha de las cuales aproximadamente 12 Ha fueron afectadas por un incendio, se tomaron muestras del área quemada (Q) y otras en un punto control (C) dentro de la misma reserva, el muestreo se realizó dos meses después de ocurrido el evento (Figura 2).

Figura 1. Mapa del área de estudio. Ubicación de la reserva Santafé de los Guaduales en imagen satelital del casco urbano de Ibagué.



Fuente: Image DigitalGlobe, 2017 (Google Earth)

Figura 2. Registro fotográfico del área de estudio. a. área control; b. área afectada por el incendio; c. acercamiento del área afectada por el incendio.

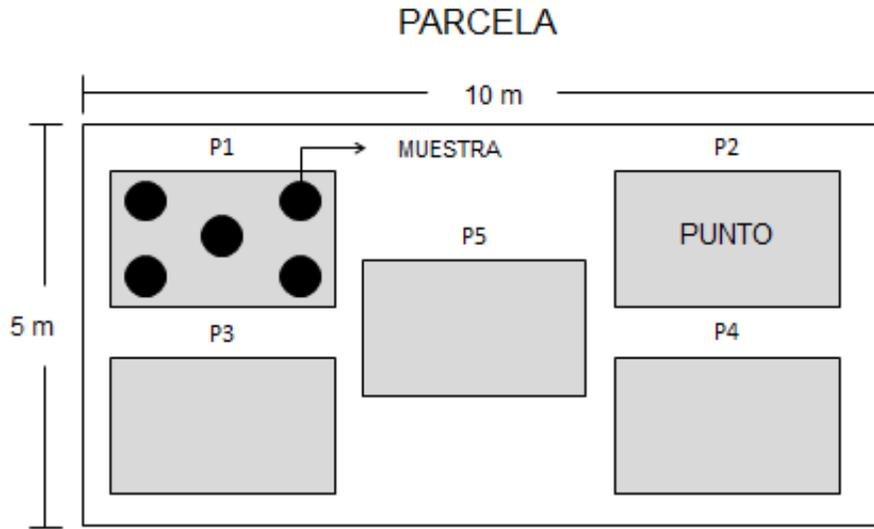


Fuente: Autor

3.2. MUESTREO DEL SUELO

Se delimitó una parcela de un área de 10 x 5 m para el suelo Q y otra para C. La muestra se tomó en forma de “X” y se realizaron cinco repeticiones, de tal manera que se obtuvieron 5 muestras compuestas por parcela (Figura 3). La muestra fue tomada a una profundidad de 20 cm, para esto se utilizó un barreno el cual se desinfectó con hipoclorito al 10% entre tratamientos, cada muestra fue homogenizada y se depositó en una bolsa plástica. Las muestras compuestas fueron llevadas al laboratorio, en nevera de icopor a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Figura 3. Esquema de la metodología de colecta de las muestras de suelo.



Fuente: Autor

3.3. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

3.3.1. Biomasa-C y actividad microbiana: se estimó el carbono de la biomasa microbiana y la actividad respiratoria y enzimática (deshidrogenasa y fosfatasa ácida y alcalina).

La biomasa microbiana-C se evaluó con el método de fumigación-extracción según Vance, Brookes y Jenkinson (1987), para esto se realizó la fumigación de 20 g de suelo con la adición de 25 ml cloroformo (libre de etanol) en un recipiente que se incubó por 24 horas con las muestras, luego se llevó a cabo la extracción con una solución de sulfato de potasio (0.5M) y se determinó el carbono microbiano tras adicionar dicromato de potasio (0,066 M), ácido sulfúrico y ácido ortofosfórico al extracto, finalmente éste fue titulado en presencia de difenilamina con sulfato ferroso amoniacal (0,033 M). Los valores se expresaron en μg de C por gramo de suelo.

La estimación de la respiración edáfica (producción de CO_2), se realizó incubando 20 g de suelo con una solución de NaOH por 3 días en un recipiente hermético, luego la solución fue titulada con HCl en presencia de fenolftaleína; para el caso de la respiración

inducida, se agregó glucosa al 0.5% en el sustrato (Alef, 1995). Los resultados se expresaron en mg de CO₂ por gramo de suelo.

La actividad de la enzima deshidrogenasa se evaluó siguiendo la metodología de Casida, Klein y Santoro (1964); para esto se adicionó una solución de cloruro de trifenil tetrazolio (1.5%) a una muestra de suelo, ésta se incubó en baño maría a 37°C por 24 horas, después se le agregó metanol y se centrifugó; se realizó la lectura del sobrenadante en el espectrofotómetro a 485 nm. Los resultados se expresaron en µg TTF por gramo de suelo en 24 horas.

La actividad de las enzimas fosfatasa ácida (FAc) y alcalina (FAlc) fueron cuantificadas según la metodología propuesta por Tabatabai y Bremner (1969); a las muestras de suelo (Q y C) se les adicionó Tampón MUB (pH 6.5 para FAc y pH 11 para FAlc) y solución de p-nitrodenilfosfato de sodio (0.05M), luego se incubaron a 37°C por 30 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se les agregó NaOH (0,5 M), la suspensión se filtró para luego proceder a realizar la lectura de la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en µg de PNF por gramo de suelo seco en 1 hora.

3.3.2. Densidad total y de los grupos funcionales: La densidad total y de los grupos funcionales de microorganismos, se determinó a través de la cuantificación en medios de cultivos, previo al aislamiento se realizaron diluciones seriadas siguiendo el protocolo del IGAC (2006), de tal forma que se tomaron 10 g (equivalente peso seco) de suelo y se diluyeron en 90 ml de solución salina al 0,85% (10^{-1}), a partir de ésta y en tubos con 9 ml de solución salina se agregó 1 ml de la dilución anterior, sucesivamente hasta obtener las diluciones deseadas.

Se empleó la técnica de recuento en placa en bacterias, hongos, solubilizadores de fosfato y celulolíticos. Para bacterias, se usó el medio Agar Nutritivo según las instrucciones del fabricante, en hongos se empleó el Agar Martín (KH₂PO₄, 0,5 g; K₂HPO₄, 0,5 g; MgSO₄, 0,5 g; Peptona, 5 g; Dextrosa, 10 g; extracto de levadura, 0,5 g;

rosa de bengala, 0,05; sulfato de estreptomina, 0,03; agar-agar, 18 g) (Curvelo y Rojas, 2010) y para los solubilizadores de fosfato y celulolíticos, los medios selectivos, agar Pikovskaya (Glucosa, 10 g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 2,5 g; NaCl, 0.2 g; KCl, 0.2 g; MgSO_4 , 0.1 g; MnSO_4 , 0.0025 g; FeSO_4 , 0.0025 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; extracto de levadura, 0.5 g y Agar, 15 g; púrpura de bromocresol, 0.1g) (Sáenz, 2006) y Agar Carboximetilcelulosa (Celulosa en polvo, 5 g; NaNO_3 , 1 g; Na_2HPO_4 , 1.2 g; KH_2PO_4 , 0.9 g; MgSO_4 , 0.5 g; KCl, 0.5 g; Extracto de levadura, 0.5 g; Caseína hidrolizada, 0.5 g y Agar 15 g; después de cinco días de incubación se realizó la prueba de rojo Congo) (IGAC, 2006).

La densidad del grupo amonificantes se cuantificó con la técnica del número más probable, se utilizó como medio de cultivo peptona bacteriológica y se incubó a 30°C durante 48 h; la producción de amonio se determinó por medio del reactivo de Nessler (prueba positiva: coloración rojiza) (IGAC, 2006).

3.3.3. Técnicas independientes de cultivo: como complemento a la evaluación microbiológica se emplearon algunas técnicas independientes de cultivo, éstas se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología del suelo de la Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba-Brasil. Se analizó la estructura de la comunidad de bacterias y BOA por medio de la técnica DGGE y se cuantificó el grupo bacterias con la técnica qPCR. Para esto se realizó la extracción del ADN total a partir de 0,4 g de suelo con el kit *Power Soil DNA Isolation kit* (MoBio, EUA), según las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN se hizo la PCR para DGGE.

Se llevó a cabo una PCR acoplada para bacterias, ésta contó con una primera reacción, en la que se usaron los iniciadores 799F y 1492 R, siendo el tamaño del fragmento esperado de 693 pb. La reacción fue realizada para un volumen de 25 µl, de tal forma que contenía 1,87 µl de MgCl_2 (25 mM), 2,0 µl de dNTP's (2,5 mM), 2,5 µl de Taq Buffer, 0,1 µl de cada uno de los iniciadores (200nM), 0,05 µl de BSA 10mg.ml⁻¹, 0,5 µl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation USA) y 16,87 µl de agua desionizada estéril; las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C; seguida por 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 40 segundos a 53°C y 40 segundos a

72°C; y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Una segunda reacción con los iniciadores U968GC y R1387; el fragmento esperado fue de 419 pb. La reacción se realizó en un volumen de 50 µl, de tal forma que contenía 5 µl de MgCl₂ (25 mM), 4 µl de dNTP's (2,5 mM), 5 µl de Taq Buffer, 0,2 µl de cada uno de los iniciadores (200nM), 0,5 µl de formamida, 0,5 µl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation USA) y 33,6 µl de agua desionizada estéril; las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial por 4 minutos a 94°C; seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 72°C; una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para BOA también se realizó una PCR acoplada, en la primera reacción se usaron los iniciadores CTOFA/B, CTOF y CTO654r. La reacción se hizo para un volumen de 25 µl, de tal forma que contenía 1,75 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl de dNTP's (2,5 mM), 2,5 µl de Taq Buffer, 0,050 µl del iniciador CTOFA/B, 0,025 µl de CTOF y 0,075 µl de CTO654r (200nM), 0,5 µl de BSA 10mg.ml⁻¹, 0,1 µl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation USA) y 18 µl de agua desionizada estéril; las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial por 1 minutos a 93°C; seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 92°C, 1 minuto a 57°C y 45 segundos a 68°C; una extensión final de 5 minutos a 68°C. En la segunda reacción se usaron los iniciadores 341f y 518r; esperándose un fragmento de 177 pb. Para un volumen de 25 µl, se usó 1,75 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP's (2,5 mM), 2,5 µl de Taq Buffer, 0,1 µl de cada uno de los iniciadores (200nM), 0,5 µl de formamida, 0,2 µl de Taq polimerasa (Invitrogen Corporation USA) y 17,85 µl de agua desionizada estéril; las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial por 10 minutos a 95°C; seguida por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 57°C y 3 segundos a 72°C; una extensión final de 30 minutos a 72°C. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en el termociclador, modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Una vez se obtuvieron los productos de la PCR, se realizó el análisis de DGGE en el equipo *phorU2 system* (Ingeny); el gradiente desnaturalizante fue de 45% a 65%. Las condiciones de electroforesis fueron de 65°C por 16 horas a 100 V. Después de terminada la electroforesis, se retiró el gel y se coloreó con *Sybr Green* (Invitrogen) en

TAE 0,5 X en la oscuridad por una hora, luego se fotografió en el transiluminador y se procesó el perfil de bandas con el software *ImagineQuant TL unidimensional*.

Finalmente, se cuantificó el gen 16S en bacterias con qPCR, las reacciones fueron hechas en duplicado en el equipo *Applied Biosystems* (StepOne), el sistema de detección utilizado fue *Sybr Green*; todas las reacciones fueron para un volumen de 20 µl, se usó 10 µl del kit *Platinum Quantitativo PCR SuperMix-UDG kit* (Invitrogen); 7,7 µl de agua desionizada; 0,5 pmol µL⁻¹ de los iniciadores P1 (5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') y P2 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') y 0,3 µl de BSA; con las condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos.

3.4. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL SUELO

Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron: humedad edáfica por el método gravimétrico; pH en H₂O por el método potenciométrico con relación suelo: agua (p/v) 1:1; nitrógeno total por el método Kjeldhal; amonio mediante la extracción con KCl y cuantificación potenciométrica; fósforo disponible por el método de Bray y carbono orgánico por el método de Walkley y Black. Estos se realizaron en el Laboratorio de servicios de extensión (LASEREX) de la Universidad del Tolima.

3.5. ÍNDICE DE MINERALIZACIÓN

Adicional a los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos determinados, se calculó un índice combinado, denominado, índice de mineralización del Carbono (Dommergues 1960), definido como:

$$\frac{C - CO_2}{C \text{ total}} \times 100$$

Donde:

C - CO₂: es la cantidad de gas carbónico en mg de CO₂ por gramo de suelo, obtenido en la respiración basal.

C total: es el carbono total determinado por el método Walkley y Black.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se aplicó la prueba de Shapiro Wilk a los datos obtenidos, para aquellos que no soportaron el supuesto de normalidad se hizo la prueba de Kruskal-Wallis y para los demás un análisis de ANOVA, ambas pruebas con el fin de determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ test de Tukey) entre las áreas evaluadas. Además, se realizó un análisis de componentes principales para evaluar las relaciones entre las variables fisicoquímicas y microbiológicas y un análisis de coordenadas principales para los perfiles de bandas obtenidos del DGGE; todos los estadísticos se hicieron con el programa PAST 3.14.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque la mayoría de los atributos microbiológicos evaluados disminuyeron en el suelo Q, ninguno de ellos presentó diferencia significativa con el suelo C (Tabla 1). De estos, la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa fueron los atributos que presentaron una mayor reducción (30% y 23% respectivamente), seguidos de la biomasa-C (21%) y la respiración inducida (19%); contrario a estos parámetros, la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina se incrementaron en un 10% y 7% con respecto al suelo control.

Tabla 1. Comparación de los atributos microbiológicos (biomasa-C y actividad microbiana) en los dos ambientes evaluados.

Parámetro	Suelo quemado (Q)	Suelo control (C)
Biomasa-C ($\mu\text{g C g}^{-1}$)	254,02 \pm 78,64 _a	322,56 \pm 80,55 _a
Respiración basal ($\text{mg CO}_2 / \text{g de suelo}$)	6,97 \pm 2,81 _a	10,03 \pm 3,11 _a
Respiración inducida ($\text{mg CO}_2 / \text{g de suelo}$)	49,79 \pm 5,09 _a	62,23 \pm 11,39 _a
Deshidrogenasa ($\mu\text{g TTF g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)	4,24 \pm 1,57 _a	5,52 \pm 2,16 _a
Fosfatasa ácida ($\mu\text{g PNF. g}^{-1} \text{ suelo seco. hora}$)	834,39 \pm 100,94 _a	755,05 \pm 279,64 _a
Fosfatasa alcalina ($\mu\text{g PNF. g}^{-1} \text{ suelo seco. hora}$)	616,59 \pm 38,76 _a	570,92 \pm 230,93 _a

Valores con diferentes letras, difieren significativamente según el test de Tukey a 5%.

La actividad respiratoria, tanto basal como Inducida, ha sido reportada como un parámetro sensible en incendios de alta intensidad (pérdida total de la cobertura vegetal edáfica y capa de ceniza de gran espesor), ya que se ha reducido hasta en un 82% (Vega et al., 2013); sin embargo, este parámetro no siempre responde de la misma manera, se ha observado que también puede incrementarse (Mataix-Solera y Guerrero, 2007); esto se debe principalmente a la intensidad del incendio o al tiempo transcurrido después del mismo. En este sentido, la disminución observada puede ser la respuesta al efecto directo de un incendio de mediana intensidad, como también puede deberse al tiempo que transcurrió después de la quema (dos meses), algunos autores han señalado que durante los primeros meses los cambios en este parámetro no son relevantes, pero luego de seis u ocho meses se observa una disminución significativa de la actividad de la respiración edáfica (Bárcenas-Moreno et al., 2011; Fontúrbel et al., 2012).

Para el caso de la biomasa-C, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Fontúrbel et al., (2012), en donde también se observó una disminución del 21% de la biomasa microbiana en el suelo afectado con respecto al control, los autores justificaron la no tan notable reducción, con el hecho de que las máximas temperaturas alcanzadas en el incendio (incendio controlado) fueron de corta duración, por lo tanto, el efecto negativo sobre la biomasa no fue representativo. Además, teniendo en cuenta que los hongos contribuyen entre un 60 – 85% a la biomasa microbiana y dado que para este estudio éstos se vieron poco afectados en densidad (Tabla 2), esta respuesta pudo deberse a la estabilidad de este grupo (Mataix-Solera y Guerrero, 2007).

La actividad enzimática suele verse muy afectada por el calor, pues por su naturaleza proteica la mayoría de las enzimas son desnaturalizadas bajo elevadas temperaturas (Mataix-Solera y Guerrero, 2007; Mataix-Solera, et al., 2009). En el caso de la enzima deshidrogenasa, debido a que esta realiza funciones intracelulares y solo se encuentra dentro de las células vivas, su disminución pudo darse como consecuencia de la mortalidad de la microbiota que la contiene a causa del efecto directo del fuego (Zamora, Pastor Mogollón y Rodríguez, 2005), como también, a condiciones post-incendio, pues se ha indicado que la actividad de la deshidrogenasa puede estar directamente

relacionada con la materia orgánica (MO), por lo que la pérdida significativa del carbono orgánico (-46%), el cual es el principal elemento que constituye la MO, pudo influir en la actividad de esta enzima (Zamora, et al., 2005). En cuanto a las enzimas fosfatasas ácida y alcalina, ya que el grupo de solubilizadores de fosfato se vio significativamente afectado, es posible que la actividad enzimática sea producto de macroorganismos (Moreira y Siqueira, 2006; Mataix-Solera, et al., 2009), como plantas, las cuales son capaces de producir enzimas fosfatasas por las raíces e incluso de algunos invertebrados como las lombrices de tierra que también liberan P, adicional a esto, es de destacar que existen enzimas fosfatasas extracelulares y enzimas fosfatasas libres las cuales conservan su actividad en el suelo (Arzuaga, Fernández-López, Dalurzo y Vazquez 2005; Fernández, Sagardoy y Gómez, 2008).

La densidad microbiana total y de los grupos funcionales, mostró una disminución en Q con respecto a C, la cual fue significativa según el test de Tukey para la densidad total en bacterias (evaluada en medio de cultivo) y para los grupos funcionales (solubilizadores de fosfato, celulolíticos y amonificantes) (Tabla 2).

Para este estudio el hecho de que los hongos hayan mostrado mayor resistencia que las bacterias (cuantificadas en medio de cultivo), puede deberse a la alta capacidad de tolerancia de los hongos a diferentes condiciones de estrés, la cual a su vez corresponde a que este grupo presenta diferentes mecanismos de resistencia tanto en estructuras, como en morfología y fisiología que les permite sobrevivir a diferentes condiciones (Varón-López, 2010). Además, les es posible también sobrevivir en forma de esporas, por ejemplo, el hongo *Neosartorya fischeri* resiste al fuego en forma de spora y en el post-fuego se constituye en una especie dominante pues su germinación es estimulada por el estrés térmico (Mataix-Solera et al., 2011).

Tabla 2. Comparación de la densidad total de bacterias y hongos y de los grupos funcionales, solubilizadores de fosfato, celulolíticos y amonificantes en los dos ambientes evaluados.

Grupo microbiano	Suelo quemado (Q)	Suelo control (C)
Log ₁₀ UFC/g de suelo	5,22 ± 0,14 b	5,49 ± 0,09 a
Bacterias qPCR: copias del gen 16s en LOG ₁₀ / g de suelo	11,03 ± 1,08 a	11,69 ± 1,39 a
Hongos (Log₁₀ UFC/g de suelo)	4,11 ± 0,19 a	4, 57 ± 0,40 a
Solubilizadores de fosfato (Log₁₀ UFC/g de suelo)	6,49 ± 0,28 b	7,04 ± 0,16 a
Celulolíticos (Log₁₀ UFC/g de suelo)	5,20 ± 0,06 b	5,91 ± 0,46 a
Amonificantes (Log₁₀ UFC/g de suelo)	2,37 ± 0,36 b	3,56 ± 0,17 a

Valores con diferentes letras difieren significativamente según el test de Tukey a 5%.

Los resultados obtenidos en la densidad de bacterias evaluadas por medio de cultivo y qPCR, guardan relación en cuanto a la proporción de disminución en Q con respecto a C, pues se observó una reducción de la densidad del 4% y 5% respectivamente; Sin embargo, existe una marcada diferencia de la densidad obtenida en ambas técnicas, ya que en medio de cultivo la densidad media para Q fue 1.7×10^5 y para C fue 3.1×10^5 mientras que en qPCR fue 3.2×10^{11} y 3×10^{12} para Q y C respectivamente; es posible que esta diferencia numérica se deba al estado de cultivabilidad y no cultivabilidad de los microorganismos, pues algunos de ellos no responden al medio de cultivo por la falta de nutrientes o condiciones específicas y son por lo tanto viables pero no cultivables, esto genera conteos bajos en medios de cultivo con respecto a técnicas independientes de cultivo (Olguín, Esteve-Zarzoso, Rozès, Mas y Guillamón, 2006). Sin duda alguna, la qPCR es una técnica altamente sensible, específica y permite la detección de diferentes microorganismos, además en la mayoría de los casos es mucho más rápida que los

métodos convencionales dependientes de cultivo (Postollec, Falentin, Pavan, Combrisson y Sohier, 2011), no obstante, estos últimos no son obsoletos, pues para este tipo de estudios, es de mayor importancia observar la relación del ambiente afectado con el sitio control que realizar una comparación con base a un valor límite o un rango universal que represente las condiciones óptimas del suelo, pues se entiende que cada sistema tiene características propias en cuanto a la cantidad y actividad de las diferentes poblaciones microbianas (Abril, 2003).

De los grupos funcionales evaluados, los amonificantes fueron los más sensibles (-33%), seguidos de los celulolíticos (-12%) y por último los solubilizadores de fosfato (-7%); este comportamiento puede darse principalmente por el efecto directo del fuego sobre las poblaciones microbianas y de forma indirecta, como respuesta a la pérdida de nutrientes y cambios en las características del suelo (Mataix-Solera et al., 2009).

En un estudio realizado por Gómez-Luna, Rivera-Mosqueda, Dendooven, Vázquez-Marrufo y Olalde-Portugal (2009) los amonificantes se redujeron de forma significativa en el área afectada como consecuencia de las condiciones altamente estresantes a las que fue sometido el ambiente edáfico (zona con quema constante); sin embargo, teniendo en cuenta las condiciones de éste estudio, la reducción que se presentó puede deberse al hecho de que la amonificación es uno de los procesos más importantes en los suelos de BST, pues más del 90% del nitrógeno total mineralizado en estos suelos corresponde a la forma de amonio (González-Pedraza y Dezzeo, 2014).

Los microorganismos celulolíticos son uno de los más sensibles del ciclo del C, son biodicadores óptimos de cambios inmediatos y reflejan el estado del carbono en el suelo, reaccionan principalmente a la pérdida de material celulósico (Abril y González, 1999; Abril, 2003; Beltrán y Lizarazo, 2013), por lo que su reducción en el área afectada puede ser consecuencia de la disminución significativa del carbono orgánico (-46%); dado que responden a la disponibilidad de materia orgánica de tipo celulósica, la cual es aportada por la vegetación, es de esperar que con el crecimiento de nueva cobertura vegetal, las comunidades celulolíticas se recuperen (Beltrán y Lizarazo, 2013; Vieira, 2016). Por

último, en el caso de los solubilizadores de fosfato su reducción posiblemente se debe a el estrés, tanto químico como físico del ambiente (Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013).

Se encontró una mayor sensibilidad en el conteo de los grupos funcionales comparado con el conteo total, lo cual puede explicarse por la alta diversidad microbiana presente en los grupos de bacterias y hongos, en donde muchas y variadas especies responden de forma diferente al impacto, por lo que la densidad de unas especies puede enmascarar el efecto negativo en las demás (Abril, 2003).

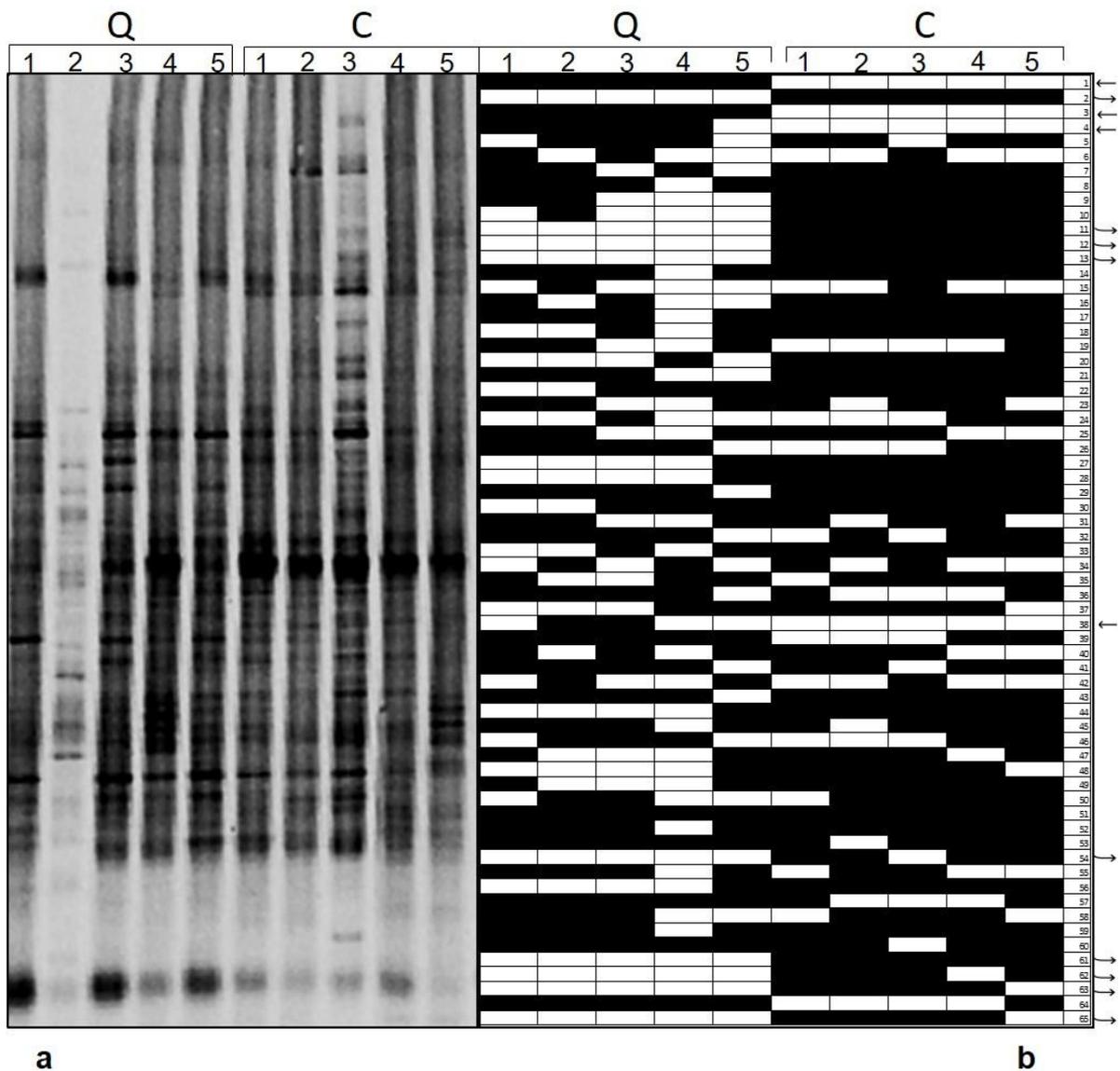
Finalmente, con respecto a los métodos usados para evaluar el efecto del incendio en la microbiota, la estructura de la comunidad microbiana, mediante la técnica de DGGE mostró diferencias en los perfiles de las bacterias y BOA entre Q y C. Se determinó la riqueza de especies representada por el número total de diferentes bandas (genotipos) detectadas en el suelo; la mayor riqueza se encontró en C (valor promedio), con el 72% de las 65 bandas encontradas para el perfil del grupo bacterias, mientras que Q tuvo un valor de riqueza de especie del 51%; la diferencia entre los ambientes evaluados es significativa según el test de Tukey. En la Figura 4 es posible observar cómo cambia la comunidad bacteriana, por ejemplo, 9 bandas solo se encuentran en los puntos de C, mientras 4 bandas son exclusivas de Q.

En el diagrama de análisis de coordenadas principales (Figura 5), es posible ver como difieren las comunidades bacterianas presentes en las áreas de estudio, las cuales se agrupan marcadamente; las coordenadas principales explican el 75,8% de la varianza total, siendo 57,35% del PCo1 y 18,45% del PCo2, los puntos del suelo C se relacionan de forma positiva a los dos componentes mientras Q muestra un comportamiento inverso.

De los métodos usados para evaluar el grupo de bacterias (medio de cultivo, qPCR y DGGE), el análisis de DGGE fue el que mostró mayor diferencia entre los sitios Q y C; en un estudio realizado por Cury (2002), en el cual se evaluaron las comunidades microbianas de suelo de manglar como indicadoras de impacto (contaminación con

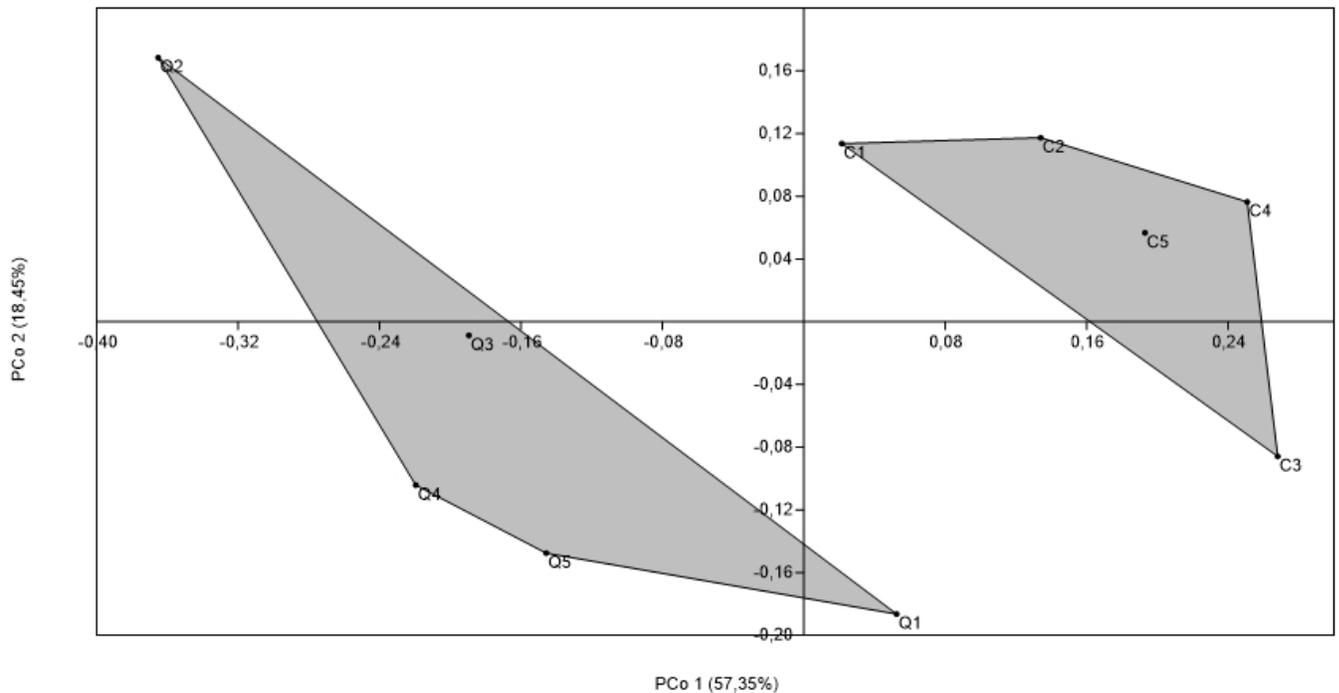
petróleo), se encontró que este tipo de análisis fue más sensible que los métodos que evaluaron la densidad, esto reafirma que las técnicas que evalúan el cambio en la comunidad son más sensibles que aquellas que solo determinan la abundancia de la misma.

Figura 4. Perfil de bandas de bacterias en los ambientes estudiados **a.** gel de DGGE **b.** diagrama del perfil de bandas (las flechas hacia la izquierda (←) representan las bandas que solo se encuentran en Q y hacia la derecha (→) se señalan las bandas exclusivas de C).



Fuente: Autor

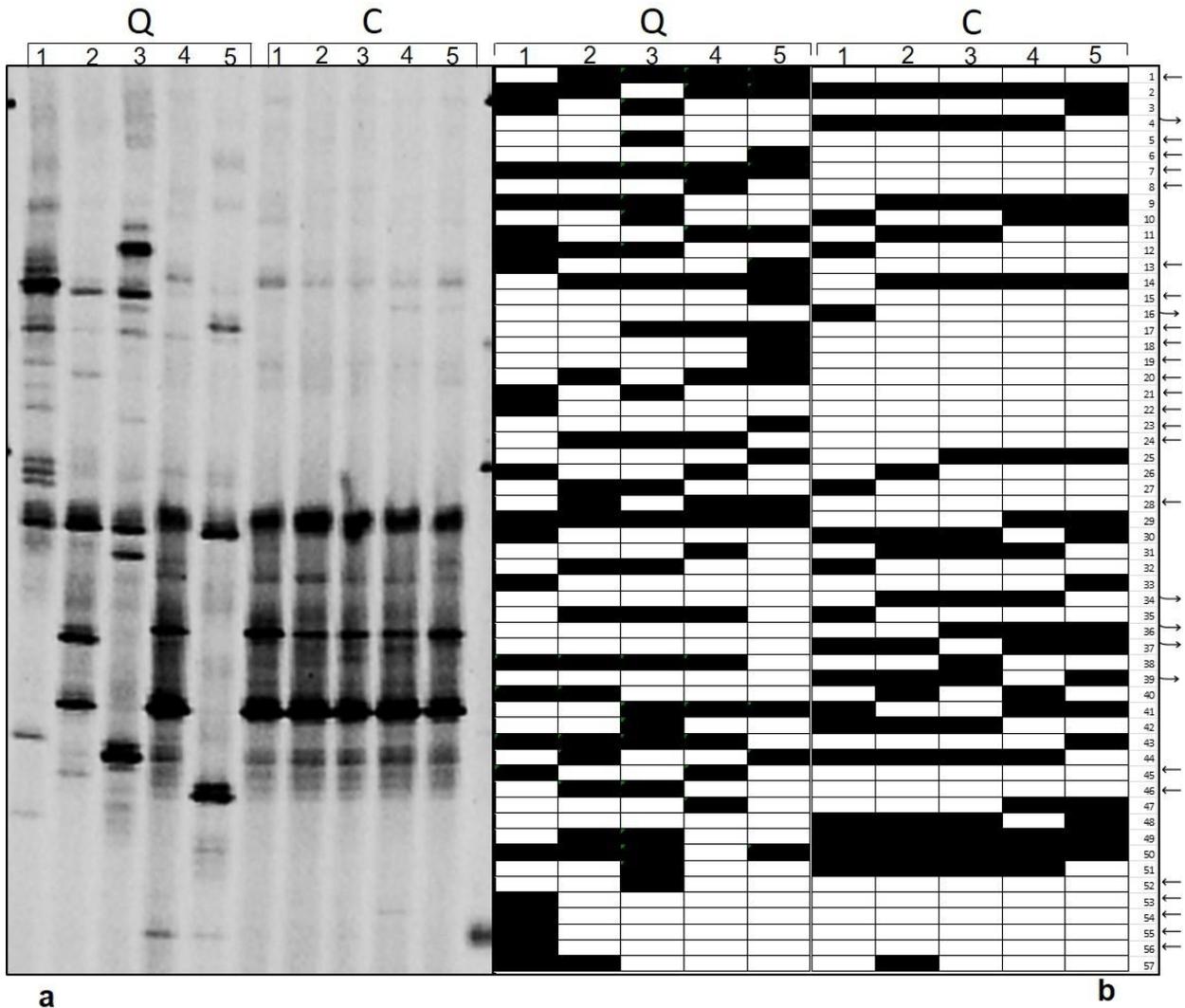
Figura 5. Diagrama de análisis de coordenadas principales de bacterias en los ambientes evaluados, a partir de los datos de DGGE. (Q1 a Q5: son los puntos del suelo Q, al igual C1 a C5 son los puntos del suelo C).



Fuente: Autor

Contrario a lo observado en el grupo de bacterias, la comunidad de BOA presentó mayor riqueza de especies en Q, con el 37% de las 57 bandas encontradas en este grupo, mientras que C tuvo un valor de riqueza de especie del 31%; los ambientes evaluados mostraron diferencia significativa según el test de Tukey. En el perfil de bandas de BOA, 23 bandas solo se encuentran en por lo menos uno de los puntos de Q y 6 son exclusivas de C (Figura 6).

Figura 6. Perfil de bandas de BOA en los ambientes evaluados **a.** gel de DGGE **b.** diagrama del perfil de bandas. (Las flechas hacia la izquierda (←) representan las bandas que solo se encuentran en Q y hacia la derecha (→) se señalan las bandas exclusivas de C).

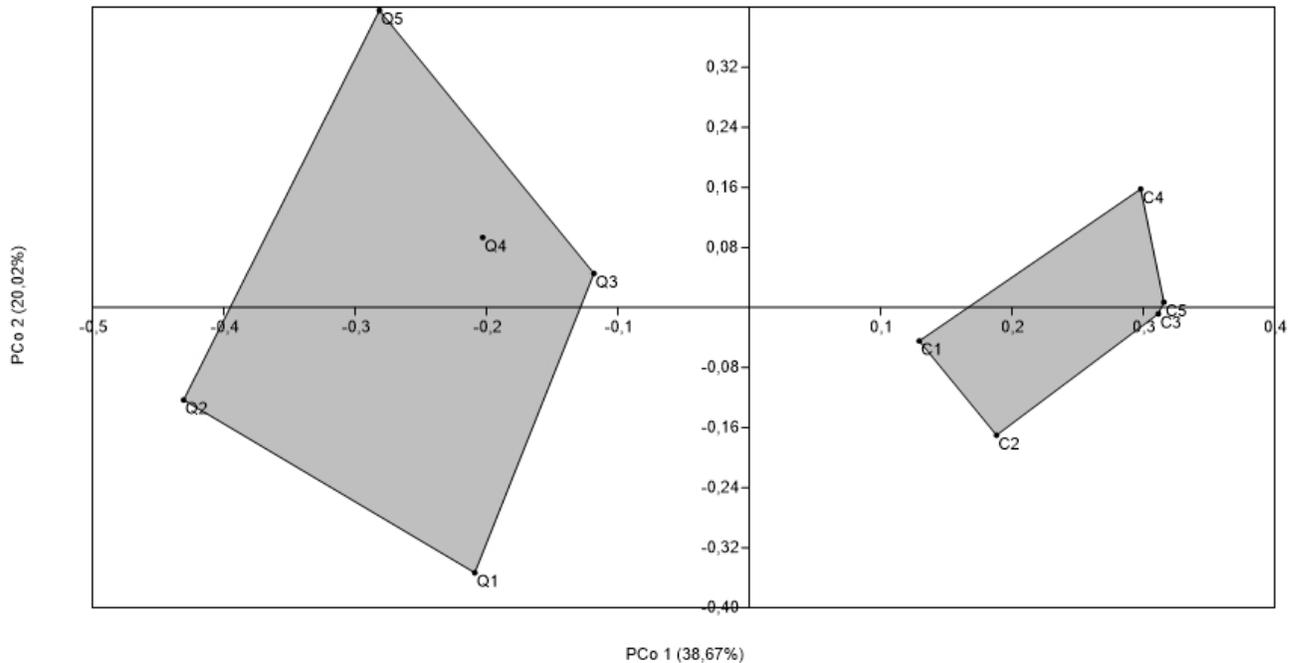


Fuente: Autor

En el diagrama de análisis de coordenadas principales de BOA (Figura 7), se observó un agrupamiento con marcada diferencia entre las áreas de estudio; las coordenadas principales explican el 58,6% de la varianza total, siendo 38,6% del PCo1 y 20% del PCo2, los puntos del suelo C se relacionan de forma positiva al componente 1, mientras

que Q se relaciona negativamente; en cuanto al componente 2, ambos ambientes se relacionan a este.

Figura 7. Diagrama de análisis de coordenadas principales de BOA en los ambientes evaluados, a partir de datos del DGGE. (Q1 a Q5: son los puntos del suelo Q, al igual C1 a C5 son los puntos del suelo C).



Fuente: Autor

Ya que la nitrificación es un proceso realizado por una pequeña diversidad de organismos y está severamente restringido a ciertas condiciones para que ocurra, por ejemplo requiere de un pH óptimo que oscila entre 6,6 y 8 (Dias, 2016), para este estudio es posible que la mayor riqueza de especie en Q sea una respuesta al aumento en el pH (Tabla 4); esto sugiere que las comunidades preexistentes pudieron verse favorecidas por este cambio en el ambiente, lo que generó un incremento en la densidad de especies que normalmente se encuentran en bajo número en este ecosistema; pues es sabido que una de las limitaciones de la técnica de PCR-DGGE es la amplificación preferencial de algunas sub-poblaciones dentro de la comunidad microbiana, de modo tal que las

bandas observadas solo representan las especies más abundantes en la muestra (Cury, 2002).

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, cuatro de los seis parámetros analizados, mostraron una reducción significativa en el área perturbada (Tabla 3), para este estudio fueron el nitrógeno y el carbono orgánico los más afectados, con pérdidas del 56% y 43% respectivamente; la disminución de éstos es una consecuencia directa de la acción del incendio, que provoca la volatilización de nutrientes, además, a causa de la pérdida de cobertura vegetal, el suelo queda expuesto a insolación, acción del viento y escorrentías que favorece la pérdida de nutrientes post-incendio (Abril y González, 1999; Mataix-Solera y Guerrero, 2007).

Tabla 3. Comparación de los atributos fisicoquímicos en los dos ambientes evaluados.

Parámetro	Suelo quemado (Q)	Suelo control (C)
Amonio mg/Kg	13 ± 1,41 _b	16,5 ± 0,35 _a
Fósforo disponible mg/Kg	0,675 ± 0,09 _a	0,64 ± 0,01 _a
% de Nitrógeno	0,22 ± 0,04 _b	0,51 ± 0,02 _a
% de Carbono orgánico	2,05 ± 0,02 _b	3,62 ± 0,01 _a
pH	5,7 ± 0,21 _a	5,4 ± 0,27 _a
% de humedad edáfica	18,4 ± 2,47 _b	23,61 ± 1,06 _a

Valores con diferentes letras difieren significativamente según el test de Tukey a 5%.

Tanto el nitrógeno como el carbono orgánico han sido destacados por ser de los elementos más afectados por los incendios; en el caso del nitrógeno, éste es un elemento sensible a la pérdida a causa de su volatilidad, se registra reducciones significativas a temperaturas de 200° C y es susceptible también en forma de amonio y nitrato (Mataix-Solera y Guerrero, 2007). El carbono puede modificarse drásticamente por el fuego, tanto en cantidad como en calidad (Mataix-Solera y Guerrero, 2007); además, la disminución de microorganismos involucrados en la dinámica de nutrientes, el lavado de nutrientes

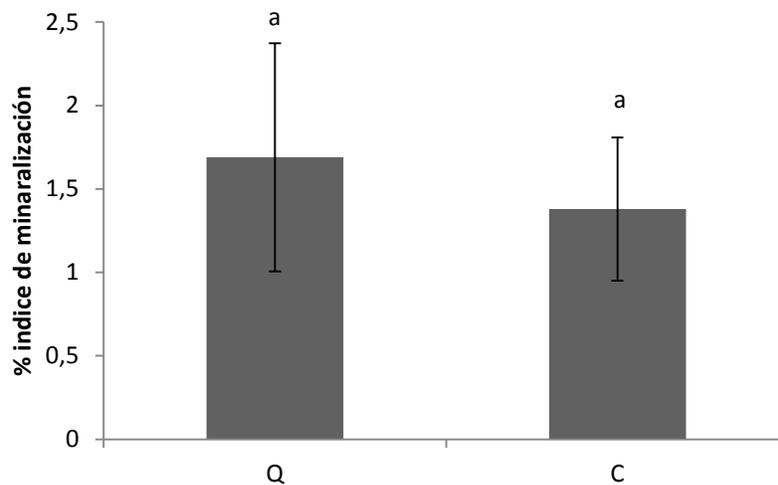
por escorrentía, la formación de humus piromórfico no degradable por bacterias y la erosión del suelo pueden influir negativamente en la formación de nuevo humus y materia orgánica que contribuya a restablecer las características iniciales del suelo (Sáenz, 2006).

La humedad edáfica, que se redujo en un 22% en Q, suele ser uno de los parámetros más afectados por este tipo de perturbación; la desecación inmediatamente inducida por el fuego, la desprotección del suelo por la desaparición de la cobertura vegetal y el aumento en la absorción de radiación a causa de las cenizas oscuras, produce la evaporación del agua contenida en el suelo (Sáenz, 2006; Mataix-Solera y Guerrero, 2007); si bien, para la época del muestreo se dio inicio a la temporada de lluvias, esta decreció como consecuencia del fenómeno del niño (El país, 2015).

Contrario a la mayoría de resultados, se observó un aumento en el pH y en el fósforo disponible, este fue del 5% (no significativo según el test de Tukey) para ambos parámetros; el fuego puede causar incrementos en el pH, ya sea por la combustión de algunos ácidos carboxílicos presentes en la materia orgánica del suelo, como también por la liberación de cationes básicos a partir de la ceniza (Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013). Asimismo, el paso del fuego puede incrementar los contenidos de fósforo, ya que la disponibilidad puede aumentar por la degradación y combustión parcial de la materia orgánica, causando desorción de los hidróxidos de Al y Fe (Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013).

Dado que se ha señalado que el cálculo de índices combinando diferentes variables, permiten interpretar con mayor exactitud la dinámica de los procesos biológicos, se calculó el índice de mineralización (respiración/carbono total), si bien éste aumentó en un 18% en Q, no mostró diferencia significativa con respecto a C (Figura 8); teóricamente valores cercanos a 1 son óptimos ya que indican un equilibrio entre la mineralización y la humificación del carbono en el suelo, mientras que en los ecosistemas muy alterados el índice se desplaza hacia valores mayores, indicando la pérdida de carbono orgánico, lo que sugiere que el suelo Q tiene una mayor pérdida de carbono (Abril, 2003).

Figura 8. Comparación del porcentaje del índice de mineralización en los ambientes evaluados.



Diferentes letras difieren significativamente según el test de Tukey a 5%.

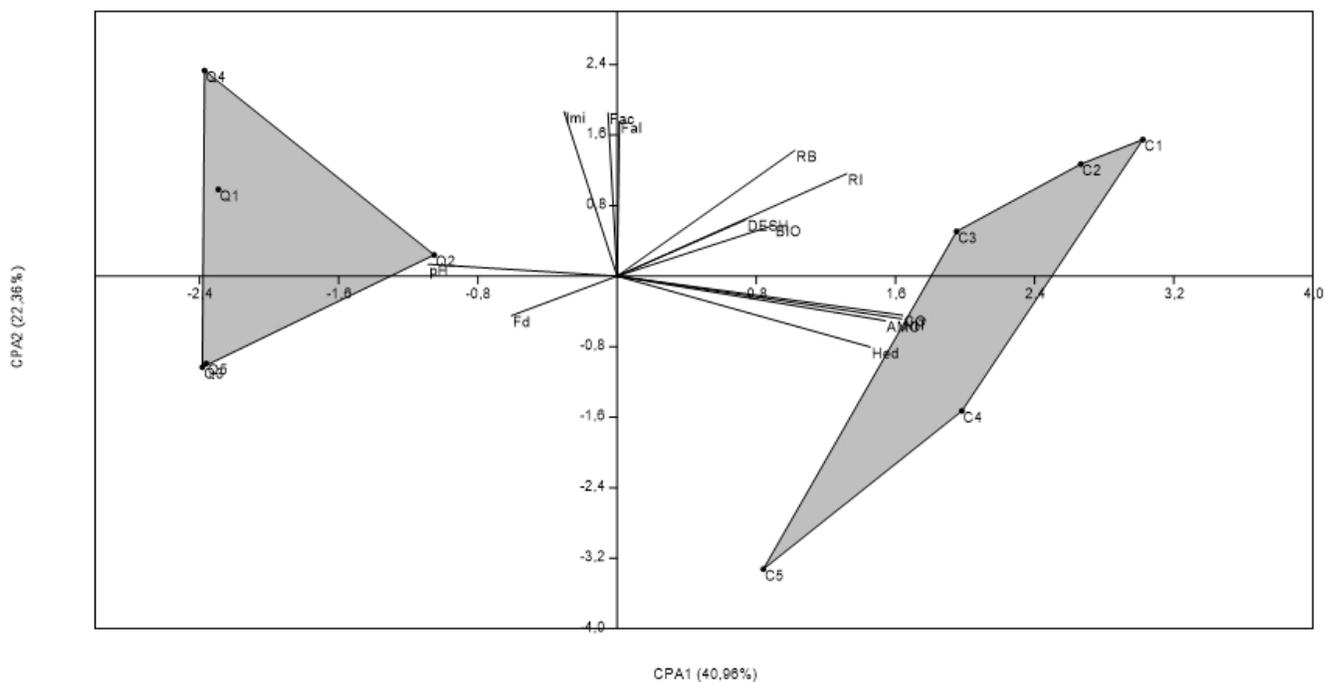
Fuente: Autor

Finalmente, debido a que los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos se relacionan de forma estrecha, se realizó un análisis de componentes principales para observar la dinámica de ambos parámetros en los sitios evaluados; de tal forma que se hizo un ACP para las variables microbiológicas relacionadas a la actividad microbiana (Figura 9) y un segundo ACP para las variables de densidad (Figura 10), ambas junto a las variables fisicoquímicas.

A manera general, se pudo observar una clara separación de los puntos correspondientes a Q y C en ambos gráficos, para la Figura 9 los componentes principales 1 y 2 explicaron el 63,32% de la varianza total, siendo 40,96% del CP1 y 22,36% del CP2; tanto los parámetros fisicoquímicos como los microbiológicos se relacionaron a ambos componentes, sin embargo, un mayor número de variables se vincularon al componente 1. Los atributos de biomasa, humedad edáfica, carbono orgánico, nitrógeno total, amonio en suelo, actividad de la enzima deshidrogenasa y respiración basal e inducida, se correlacionaron fuertemente a los puntos del área

control; mientras que el fósforo disponible, el pH, el índice de mineralización y la actividad de las enzimas fosfatasas ácida y alcalina se conectaron al área afectada por el incendio.

Figura 9. Análisis de componentes principales de la relación entre los parámetros fisicoquímicos y los atributos microbiológicos, referentes a la actividad microbiana (Fd: Fósforo disponible; pH; Imi: índice de mineralización; Fac: fosfatasa acida; Fal: fosfatasa alcalina; RB: respiración basal; RI: respiración inducida; DESH: deshidrogenasa; BIO: biomasa; CO: carbono orgánico; NIT: nitrógeno; AMO: amonio y Hed: humedad edáfica).



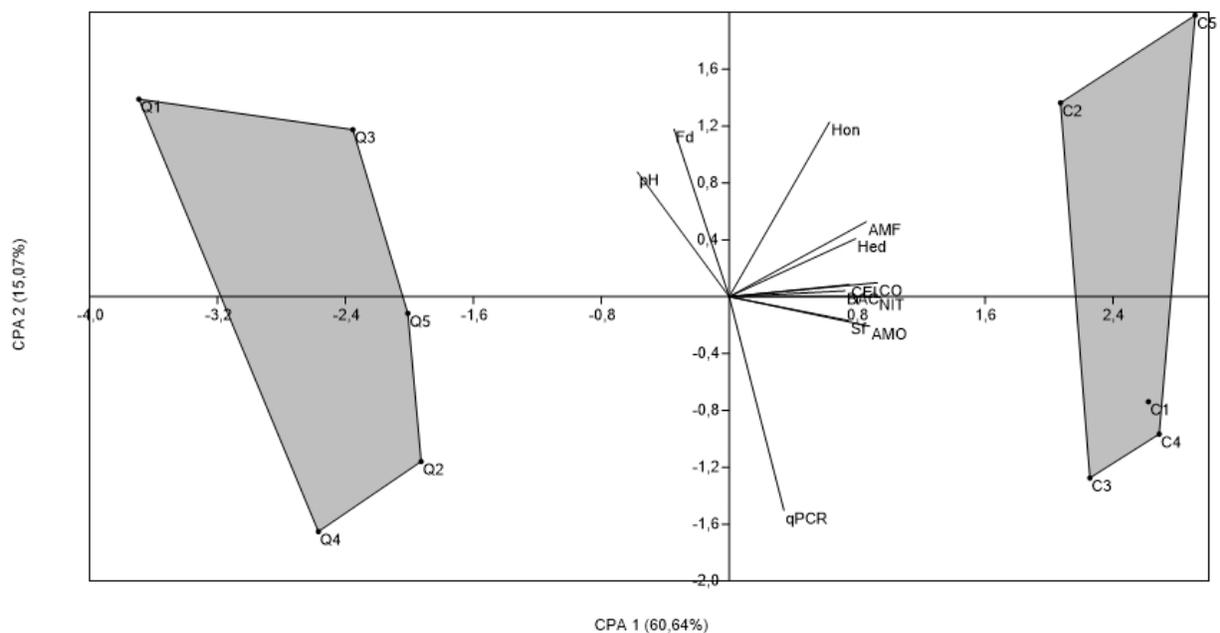
Fuente: Autor

La correlación de los parámetros de pH y fósforo disponible con Q, se debe a que el fuego favorece el incremento en el pH, lo que a su vez promueve la hidrólisis de fosfatos de aluminio y hierro, de esta forma una fracción es liberada y por tanto se da un aumento en el fósforo disponible (Beltrán y Lizarazo-Forero, 2013). Por otro lado, los parámetros de amonio, nitrógeno y carbono orgánico que se correlacionan con los puntos del área control, reflejan la pérdida de nutrientes tras un incendio. Por último, la relación entre la actividad de la enzima deshidrogenasa y la biomasa microbiana, puede deberse al hecho de que la biomasa es un componente de gran importancia de la MO y como se mencionó,

la actividad de la deshidrogenasa puede estar directamente relacionada con la materia orgánica (MO) (Zamora, et al., 2005).

En el análisis de componentes principales de la relación entre los parámetros fisicoquímicos y los parámetros microbiológicos, referentes a la densidad microbiana (Figura 10), los componentes principales 1 y 2 explicaron el 75.71% de la varianza total, siendo 60.64% del CP1 y 15.07% del CP2; para este caso también un mayor número de variables se vincularon al componente 1; de tal forma que todas las variables microbiológicas y la mayoría de las variables fisicoquímicas se correlacionaron a los puntos del área control; y tal como se representó en el gráfico anterior, los parámetros fósforo disponible y pH, se correlacionaron al área afectada por el incendio.

Figura 10. Análisis de componentes principales de la relación entre los parámetros fisicoquímicos y los parámetros microbiológicos, referentes a la densidad microbiana (pH; Fd: Fósforo disponible; Hon: hongos; AMF: amonificantes; Hed: humedad edáfica; CEL: celulóliticos; CO: carbono orgánico; BAC: bacterias; NIT: nitrógeno; Sf: solubilizadores de fosfato; AMO: amonio y qPCR: densidad de bacterias medida en qPCR).



Fuente: Autor

La relación entre las variables microbiológicas y las fisicoquímicas indica que la densidad de los grupos evaluados depende fuertemente de la cantidad y calidad del sustrato disponible; así como de la disponibilidad para el caso de los celulolíticos que muestran una estrecha correlación al carbono orgánico. Además, las condiciones del ambiente como la humedad edáfica son también un factor que condicionan la densidad de algunos grupos como los amonificantes, según lo descrito por González-Pedraza y Dezzeo (2014) las condiciones ambientales que se dan durante la época de lluvia en el BST promueven la activación de procesos microbianos que favorecen la amonificación, lo que hace suponer que este grupo puede verse afectado en densidad cuando la humedad del ambiente edáfico disminuye.

Y aunque los solubilizadores de fosfato no se relacionaron a la disponibilidad de fósforo en el suelo, su reducción más allá del efecto directo del incendio sobre la densidad de estos, puede deberse a las condiciones y disponibilidad de otros nutrientes como lo es el amonio, con el que presentó una fuerte correlación, esto responde a lo planteado por otros autores que señalan que la fuente de nitrógeno en forma de amonio promueve una mayor solubilización del fósforo por parte de los microorganismos, esto ocurre debido a la extrusión celular de protones para compensar los iones NH_4^+ asimilados (Beltrán-Pineda, 2014; Estrada, 2015).

5. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente estudio evidencian el impacto negativo de los incendios forestales en el ambiente edáfico del BST estudiado, tanto los parámetros fisicoquímicos como los microbiológicos mostraron diferencias entre los ambientes, para estos últimos fue la densidad de los grupos funcionales y la estructura de la comunidad bacteriana los que mayor sensibilidad revelaron.
- El hecho de que la biomasa-C y la actividad microbiana no hayan evidenciado diferencias significativas entre los ambientes sugiere que el incendio que afectó la zona fue de intensidad media (corta duración durante las máximas temperaturas), pues la mayoría de trabajos que usan estos parámetros en quemas, reportan una mayor sensibilidad en incendios de intensidad alta.
- La abundancia de los grupos funcionales de microorganismos (amonificantes, celulolíticos y solubilizadores de fosfato) mostraron ser un indicador más sensible que la abundancia total de bacterias y hongos.
- La técnica de DGGE es eficiente para evaluar cambios en la comunidad de bacterias y de BOA en suelos perturbados por fuego; además, dado que por medio de esta técnica se encontró mayor diferencia en el grupo de bacterias entre los ambientes evaluados, se concluye que la estructura microbiana refleja mejor los impactos ambientales.
- Los parámetros fisicoquímicos de carbono orgánico, nitrógeno total, humedad edáfica y amonio en suelo fueron sensibles al incendio, por lo que se destaca la importancia de la inclusión de estos, en estudios que usen la microbiota como bioindicadores.

- Finalmente, dado que algunos de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos se correlacionan positivamente, es necesaria la inclusión de ambos parámetros, pues éstos se complementan y permiten generar un análisis más profundo del impacto de los incendios en el ambiente edáfico.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios posteriores en la zona para observar el comportamiento de las comunidades evaluadas a través del tiempo; además es necesario incluir otros grupos funcionales relacionados a los ciclos del carbono y nitrógeno, esto con el fin de conocer más acerca de la dinámica de estos ciclos en el BST.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A. (2003). ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas?. *Ecología Austral*, 195-204.
- Abril, A. & González, C. (1999). Dinámica de la fertilidad y de las poblaciones microbianas en suelos afectados por incendios en las sierras de Córdoba (Argentina). *Agriscientia*, 16, 63-70.
- Albornoz, M. L. & Tusso, D. C. (2010). *Efecto de la restauración ecológica sobre un grupo funcional microbiano edáfico en el parque nacional natural los nevados (Cuenca río Otún)*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá:
- Alef, K. (1995). Estimation of microbial activities. En K. Alef & P. Nannipieri, *Methods In Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (págs. 192-270). Academic Press Ltd.
- Arias, A. C. (2007). *Suelos Tropicales*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Arzuaga, S. A.; Fernández-López, C.; Dalurzo, H. C. & Vazquez, S. (2005). Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida, en entisoles, alfisoles y vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen A-066*. pp, 1-4.
- Avellaneda-Torres, L. M. (2014). *Caracterización de comunidades microbianas asociadas a prácticas agrícolas y usos del suelo de la vereda El Bosque - Parque Nacional Natural de los Nevados*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Agrarias: Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- Bárcenas-Moreno, G.; García-Orenes, F.; Mataix-Solera, J.; Mataix-Beneyto, J. & Bååth, E. (2011). Soil microbial recolonisation after a fire in a Mediterranean forest. *Biology and Fertility of Soils*, 261–272.
- Beltrán, L. & Lizarazo-Forero, L. (2013). Grupos funcionales de microorganismos en suelos de páramo perturbados por incendios forestales. *Revista de Ciencias*, 17 (2), 121-136.
- Beltrán-Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15 (1).
- Campos-Bedolla, P.; Bazán, B. M.; Sanmartiní, N.; Torres, M. D.; Zapatero, B. M.; Fernández, M. A... Gullón, M. J. (2003). *Biología 1*. México: Editorial LIMUSA.
- Cañón-Cortázar, R. G.; Avellaneda-Torres, L. M. & Torres-Rojas, E. (2012). Microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno en suelos bajo tres sistemas de uso: cultivo de papa, ganadería y páramo, en el parque Los Nevados, Colombia. *Acta agronómica*, 61 (4), 371-379.
- Casida, J. R.; Klein, L. E. & Santoro, D. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil science*, 98, 371-376.
- Chaves-Bedoya, G.; Ortíz-Moreno, M. L. & Ortiz-Rojas, L. Y. (2013). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Ciencias del suelo*, 62 (1), 66-72.
- Curvelo, L. & Rojas, J. A. (2010). *Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums ascomycetes, deuteromycetes y oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia universidad Javeriana, Bogotá

- Cury, J. D. C. (2002). *Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo*. (Tesis de maestria). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba - São Paulo.
- Dias, A. C. (2016). Transformações do nitrogênio no solo. En E. J. Cardoso & F. D. Andreote, *Microbiologia do solo* (2ª Edição) (págs. 99-109). Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ.
- Docherty, K. M.; Balsler, T. C.; Bohannan, B. J. & Gutknecht, J. L. (2012). Soil microbial responses to fire and interacting global change factors in a California annual grassland. *Biogeochemistry*, 63-83.
- Dommergues, Y. (1960) La notion de coefficient de minéralization du carbone dans les sols. *Agronomie Tropicale*. 15 (1): 53-59.
- Durrer, A. & Andreote, F. D. (2016). Introdução aos métodos independentes de cultivo no estudo da microbiologia do solo. En E. J. Cardoso & F. D. Andreote, *Microbiologia do solo* (2ª Edição) (págs. 211-221). Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ.
- EL ESPECTADORa. (2015). *Bomberos de Ibagué atienden en promedio 12 incendios diarios*. Recuperado de EL ESPECTADOR: <http://www.elespectador.com>
- EL ESPECTADORb. (2015). *Cerca del 60% de los municipios del Tolima está en emergencia por incendios forestales*. Recuperado de EL ESPECTADOR: <http://www.elespectador.com>
- El país. (2015). *Fenómeno de El Niño pasó de moderado a fuerte, dice Ideam*. Recuperado de El país.com.co: <http://www.elpais.com.co>

EL TIEMPO. (2015). *Incendios forestales han arrasado unas 92.000 hectáreas en el país*. Recuperado de EL TIEMPO: <http://www.eltiempo.com>

Estrada, G. A. (2015). *Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar*. (Tesis Doctoral). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba - São Paulo.

Fernández, L. A.; Sagardoy, M. A. & Gómez, M. A. (2008). Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana norte del área sojera argentina. *Ciencia del suelo*, 26 (1), 35-40.

Fontúrbel, M. T.; Barreiro, A.; Vega, J. A.; Martín, A.; Jiménez, E.; Carballas, T... Díaz-Raviña, M. (2012). Effects of an experimental fire and post-fire stabilization treatments on soil microbial communities. *Geoderma*, 51–60.

Gómez-Luna, B. E.; Rivera-Mosqueda, M. C.; Dendooven, L.; Vázquez-Marrufo, G. & Olalde-Portugal, V. (2009). Charcoal production at kiln sites affects C and N dynamics and associated soil microorganisms in *Quercus* spp. temperate forests of central Mexico. *applied soil ecology*, 41 (1), 50-58.

González-Pedraza, A. F. & Dezzio, N. (2014). Effects of Land Use Change and Seasonality of Precipitation on Soil Nitrogen in a Dry Tropical Forest Area in the Western Llanos of Venezuela. *Scientific World Journal*, 1-11.

IDEAM. (2014). *Incendios de la cobertura vegetal*. Recuperado de IDEAM: <http://www.ideam.gov.co>

IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi) (2006). *Métodos analíticos de laboratorio de suelos*. (6ª edición). IGAC.

- Janzen, D. H. (1988). Tropical Dry Forests: The Most Endangered Major Tropical Ecosystem. En E. O. Wilson, *Biodiversity* (págs. 130-137). Washington, D.C.: National Academy of Sciences/Smithsonian Institution.
- Lagos, J. A.; Campos, I. R. & Fuentes, C. L. (2005). Efecto del herbicida atrazina sobre el metabolismo del suelo y su relación con propiedades químicas (edáficas y de tejido radical) en un suelo del municipio de Saldaña Tolima. *Revista Epsilon* (5), 60-97.
- Martínez-Nieto, P.; Correa-Torres, C.; Robles-Camargo, J. & Valderrama-Barco, M. (2014). Respuesta de poblaciones microbianas solubilizadoras de fosfato al glifosato en un ecosistema alto andino colombiano. *Revista Pilquen - Sección Agronomía* (14), 1-15.
- Mataix-Solera, J. & Cerdá, A. (2009). Incendios forestales en España. Ecosistemas terrestres y suelos. En J. Mataix-Solera & A. Cerdá, *Efectos de los incendios forestales sobre los suelos en España* (págs. 25-53). Càtedra de Divulgació de la Ciència. Universitat de Valencia.
- Mataix-Solera, J. & Guerrero, C. (2007). Efectos de los incendios forestales en las propiedades edáficas. En J. Mataix-Solera, *Incendios Forestales, Suelos y Erosión Hídrica* (págs. 4-37). España: Caja Mediterráneo, CEMACAM Font Roja-Alcoi. Alicante.
- Mataix-Solera, J.; Cerdà, A.; Arcenegui, V.; Jordán, A. & Zavala, L. M. (2011). Fire effects on soil aggregation: A review. *Earth-Science Reviews*, 44–60.
- Mataix-Solera, J.; Guerrero, C.; García-Orenes, F.; Bárcenas, G. M. & Torres, M. P. (2009). Forest Fire Effects on Soil Microbiology. En A. Cerdà & P. R. Robichaud, *Fire Effects on Soils and Restoration Strategies* (págs. 133-175). Publisher: Science Publishers, Inc.

- Minambiente. (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible). (2011). *Estrategia de corresponsabilidad social en la lucha contra los incendios forestales*. Bogotá: MinAmbiente.
- Mondragón, M. F.; Melo, A. & Gelvez, K. (2013). *Prevención de incendios forestales a través de ejercicios regionales vinculando la comunidad y demás actores locales que lleven a la protección de los bosques y los servicios ecosistémicos*. Bogotá: Minambiente.
- Moreira, F. M. & Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e Bioquímica do solo*. Lavras: Universidade Federal de Lavras.
- Moscatelli, M. C.; Lagomarsino, A.; Marinari, S.; Angelis, P. D. & Grego, S. (2005). Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. *Ecological Indicators*, 171-179.
- Nave, L. E.; Vance, E. D.; Swanston, C. W. & Curtis, P. S. (2011). Fire effects on temperate forest soil C and N storage. *Ecological Applications*, 21 (4), 1189–1201.
- Nicolaisen, M. H. & Ramsing, N. B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 189– 203.
- Niboyet, A.; Brown, J. R.; Dijkstra, P.; Blankinship, J. C.; Leadley, P. W.; Le Roux, X. ... Hungate, B. A. (2011). Global Change Could Amplify Fire Effects on Soil Greenhouse Gas Emissions. *PLoS ONE*, 6(6), e20105. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020105>
- Olguín, N.; Esteve-Zarzoso, B.; Rozès, N., Mas, A. & Guillamón, J. M. (2006). Técnicas independientes de cultivo para la identificación y cuantificación de microorganismos en el vino. *Tecnología del vino*, 34: 62-67.

- Ortiz - Moreno, M. L. (2010). Evaluación preliminar de la abundancia de hongos lignolíticos cultivables y su actividad peroxidasa, obtenidos a partir de suelos con diferentes usos agrícolas en zona rural de Villavicencio. *Orinoquia*, 171-177.
- Patiño, C. O. (2010). *Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Agropecuarias: Universidad Nacional de Colombia, Palmira.
- Perez, L. Y. (2008). *Evaluación microbiológica de la calidad del suelo en cultivos de tabaco (Nicotiana tabacum) en los municipios de Girón y Piedecuesta (Santander) utilizando como indicadores los grupos funcionales de microorganismos*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- Pizano, C. & García, H. (2014). *El bosque seco tropical en Colombia*. Bogotá, D. C.: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).
- Postollec, F.; Falentin, H.; Pavan, S.; Combrisson, J. & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food microbiology*, 28 (5): 848-861.
- Rodríguez, M. & Rodríguez, W. (2006). *PCR en tiempo real*. IBT- UNAM.
- Sáenz, D. A. (2006). *Efecto de un incendio forestal sobre grupos funcionales bacterianos edáficos en una plantación de Eucaliptus cinerea (Suesca, Cundinamarca)*. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Shen, J. P.; Zhang, L. M.; Di, H. J. & He, J. Z. (2012). A review of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in Chinese soils. *frontiers in microbiology*, 3, 1-7.

- Silva, F. D. (2012). *Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas em solos da Amazônia e resposta a mudanças na forma de uso do solo*. (Tesis Doctoral). Instituto de Ciências Biomédicas: Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tabatabai, M. A. y Bremner, J. M. (1969). Use of *p*-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
- Throback, I. N.; Enwall, K.; Jarvis, A. & Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 401-417.
- Vance, E. D.; Brookes, P. C. & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology biochemical*, 19 (6), 703-707.
- Varón-López, M. (2010). *Microbiota edáfica como indicadora da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço*. (Tesis de maestria). Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais.
- Vega, J. A.; Fontúrbe, T.; Merino, A.; Fernández, C.; Ferreiro, A. & Jiménez, E. (2013). Testing the ability of visual indicators of soil burn severity to reflect changes in soil chemical and microbial properties in pine forests and shrubland. *Plant Soil*, 73–91.
- Vella, K.; Navracsics, T.; Larigauderie, A. & Wall, D. H. (2015). *Global soil biodiversity atlas*. European commission.
- Verhamme, D. T.; Prosser, J. I. & Nicol, G. W. (2011). Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *International Society for Microbial Ecology*, 5, 1067–1071.

Vieira, A. C. (2016). *Efeito da queimada sobre atributos físico, químicos e microbiológicos do solo em área de pastagem, no sul de Minas Gerais*. (Tesis de maestria). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá - Minas Gerais.

Zamora, F.; Pastor-Mogollón, J. & Rodríguez, N. (2005). Cambios en la biomasa microbiana y la actividad enzimática inducidos por la rotación de cultivos en un suelo bajo producción de hortalizas en el estado Falcón, Venezuela. *Multiciencias*, 5 (1).

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Los suscritos:

Lizeth Carolina Ospina Céspedes	con C.C N°	1 110 538 163
Maryeimy Varón López	con C.C N°	28 556 259
Maribeb Castro González	con C.C N°	51 941 393
	con C.C N°	
	con C.C N°	

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar

No Autorizar Motivo: _____

La consulta en físico y la virtualización de **mi OBRA**, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	<input checked="" type="checkbox"/>	Artículo	<input type="checkbox"/>	Proyecto de Investigación	<input type="checkbox"/>
Libro	<input type="checkbox"/>	Parte de libro	<input type="checkbox"/>	Documento de conferencia	<input type="checkbox"/>
Patente	<input type="checkbox"/>	Informe técnico	<input type="checkbox"/>		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					<input type="checkbox"/>

Fecha Versión 02: 04-11-2016

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: 28 Mes: Septiembre Año: 2017

Autores: Firma

Nombre:	Lizeth Carolina Ospina Céspedes		C.C. 1 110 538 163
Nombre:	Maryeimy Varón López		C.C. 28 556 259
Nombre:	Maribeb Castro González		C.C. 51 941 393
Nombre:			C.C.

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.