

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN SUELOS**



**“COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN
DEL CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA EN SUELOS
ALTOANDINOS DEL PERÚ”**

Presentada por:

WENDY ELIZABETH PÉREZ PORRAS

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN SUELOS**

Lima - Perú

2020

DEDICATORIA

A mis padres Juan Carlos y Yolanda, por enseñarme a confiar en mí y haberme dado la libertad de tomar decisiones y seguir mis sueños.

A mis hermanos Gianfranco y Stephanie, por su incondicional cariño y aliento.

A Remo, por su soporte y silenciosa compañía.

AGRADECIMIENTOS

Al Ph.D. Sady García, mi asesor y amigo, por sus valiosos consejos y ayuda durante los estudios, el trabajo y la realización de la tesis.

Al Mg. Sc. Braulio La Torre, quien fue mi jefe, por su guía e influencia a seguir estudios de maestría.

A José Luis Rolando, amigo e investigador del Centro Internacional de la Papa (CIP), por todo el apoyo para la ejecución y culminación de la tesis.

A todos los amigos y compañeros que me dieron ánimos durante esta etapa.

Al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF), por las facilidades para el desarrollo de la tesis.

Al CIP y *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR), por permitirme el acceso a las muestras del proyecto.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	12
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1	EL CONTENIDO DE CARBONO COMO INDICADOR DE CALIDAD DE SUELOS	5
2.2	MUESTREO, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE SUELO PARA DETERMINACIÓN DE CBIO.....	7
2.2.1	Generalidades	7
2.2.2	Muestreo de suelos	8
2.2.3	Diseño de muestreo	8
2.2.4	Proceso de muestreo	10
2.2.5	Manejo y almacenamiento.....	12
2.3	EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y REFRIGERACIÓN DE EXTRACTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE CBIO.....	17
2.3.1	Contenido de humedad e incubación.....	17
2.3.2	Refrigeración de extractos y uso de Sulfato de Potasio (K ₂ SO ₄).....	19
2.4	COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CBIO ...	20
2.4.1	Generalidades	20
2.4.2	Procedimiento de fumigación por cloroformo para la determinación del Cbio .	22
2.4.3	Carbono oxidable en permanganato (COXP).....	25
2.5	CAMBIOS DE USO ACTUAL DE TIERRA (UAT).....	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	28
3.2	ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE SUELO.....	28
3.2.1	En el efecto del pretratamiento de la muestra y la refrigeración de extractos....	28
3.2.2	En la comparación de métodos para la determinación del Cbio y determinación de su relación con otros parámetros	29

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS	31
3.4 METODOLOGÍAS	31
3.4.1 Determinación del Cbio.....	31
3.4.2 Determinación del Carbono Oxidable en Permanganato (COXP).....	34
3.4.3 Determinación de Carbono Total (CT), Nitrógeno Total (NT) y Carbono Orgánico Total del suelo (COT)	35
3.4.4 Determinación del Stock de Carbono Orgánico del Suelo (COS stock)	35
3.4.5 Evaluación del efecto del pre-tratamiento: Ajuste de humedad e incubación, y refrigeración de extractos.....	35
3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO: AJUSTE DE HUMEDAD E INCUBACIÓN, Y REFRIGERACIÓN DE EXTRACTOS	37
4.2 COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL C BIO ...	40
4.2.1 Relación del Cbio con otros parámetros del suelo	40
4.2.2 Distribución de los suelos analizados según uso de la tierra.....	42
4.2.3 Comparación del Cbio cuantificado según las diferentes metodologías	43
4.2.4 Relaciones del Cbio con otros parámetros del suelo.....	47
V. CONCLUSIONES	61
VI. RECOMENDACIONES	62
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
VIII. ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Atributos típicos para manejo y almacenamiento de muestras de suelo.....	13
Cuadro 2: Características de los suelos evaluados.....	28
Cuadro 3: Tratamientos evaluados en el experimento.....	36
Cuadro 4: Cuantificación del Cbio en las diferentes muestras y efecto de la refrigeración a largo plazo del extracto.....	38
Cuadro 5: Cbio, COXP y COT obtenido de suelos de Ayacucho y Junín.....	40
Cuadro 6: Correlaciones del CbioS con las relaciones C:N y COT:N.....	58
Cuadro 7: Relaciones C:N y COT:N para los UAT evaluados.....	58
Cuadro 8: Correlaciones del CbioS con el COS Stock en los UAT.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo del carbono.....	5
Figura 2: Tipos de diseños de muestreo sistemáticos	8
Figura 3: Diseños de muestreo	10
Figura 4: Solubilidad de sólidos orgánicos e inorgánicos en agua, en función de la temperatura.....	20
Figura 5: Diagrama de la medición del COT por oxidación catalítica por combustión y detección por NDIR.....	25
Figura 6: Mapa de suelos del área de estudio.....	30
Figura 7: Efecto del Pre-tratamiento y refrigeración de extractos a corto plazo en el Cbio obtenido.....	37
Figura 8: Efecto de la refrigeración prolongada sobre la cuantificación del Cbio.....	39
Figura 9: Análisis de la correlación del Cbio y otros parámetros del suelo.....	41
Figura 10: Distribución de las muestras en base a sus características y según el uso de la tierra.....	42
Figura 11: Cbio con utilización del analizador de C (CbioS) en diferentes UAT.	44
Figura 12: Cbio determinado por FI (CbioI) en diferentes UAT.	44
Figura 13: Cbio determinado por FE y oxidación húmeda (CbioWB) en diferentes UAT.	45
Figura 14: Porcentaje de CT promedio para los diferentes UAT.....	47
Figura 15: Porcentaje de CT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.	48
Figura 16: Porcentaje de COT promedio para los diferentes UAT.....	48
Figura 17: Porcentaje de COT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.....	48
Figura 18: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de Suelo en descanso.....	49
Figura 19: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de maca.....	50
Figura 20: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pasto nativo.....	51
Figura 21: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pastura cultivada.....	52
Figura 22: Porcentaje de Cbio respecto a cada UAT.	53

Figura 23: Porcentaje de NT promedio para los diferentes UAT.	54
Figura 24: Porcentaje de NT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.	54
Figura 25: Relación C:N promedio para los diferentes UAT.....	56
Figura 26: Relación C:N en el análisis de medianas para los diferentes UAT.	56
Figura 27: Relación COT:N promedio para los diferentes UAT.	57
Figura 28: Relación COT:N en el análisis de medianas para los diferentes UAT.	57
Figura 29: COS Stock ($\text{MgC} \cdot \text{ha}^{-1}$) promedio para los diferentes UAT.	59
Figura 30: COS Stock ($\text{MgC} \cdot \text{ha}^{-1}$) en el análisis de medianas para los diferentes UAT...	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Estadística en el Efecto del Pretratamiento y refrigeración de extractos por 24 horas (primer ensayo).....	78
Anexo 2: Estadística en el Efecto de la refrigeración de extractos por 11 días (Segundo ensayo).....	79
Anexo 3: Estadística en la Comparación de tres métodos para la determinación del Cbio y su relación con otros parámetros del suelo.....	83
Anexo 4: Precipitado formado en el extracto por la baja solubilidad del K_2SO_4	92
Anexo 5: Origen de muestras.....	93

RESUMEN

Actualmente, ha tomado mayor importancia la utilización de fracciones activas de carbono (C) como indicadores de calidad del suelo, debido a su rápida respuesta al manejo agronómico y estrategias para la conservación de suelos. Entre ellas, el Carbono de Biomasa Microbiana (C_{bio}) destaca por su dinamismo y corto tiempo de reciclaje, evidenciando los cambios en el sistema. Generalmente, en nuestro país su determinación sigue métodos tradicionales, presentando problemas de confiabilidad, subestimación, larga duración, riesgos para la salud y contaminación ambiental. El objetivo de la investigación fue determinar la factibilidad del empleo del analizador de C TOC-L Shimadzu, bajo las condiciones de trabajo del LASPAF-UNALM. Para dicho propósito, se determinó el efecto de realizar pretratamientos a las muestras, ajuste de humedad e incubación, y la refrigeración de extractos previo al análisis, una fase crítica del procesamiento. En una siguiente etapa, se compararon dos métodos tradicionales y la utilización del analizador de C en suelos contrastantes en la zona altoandina de Junín, con diferente Uso Actual de Tierra (UAT): suelos con cultivo de maca, en descanso o barbecho, pasto nativo y pastura. Así también, la relación con otros parámetros: Carbono Total (CT), Carbono Orgánico Total (COT), Nitrógeno Total (NT), tasas C:N y COT:N, y el Stock de Carbono Orgánico (COS Stock). En el análisis de resultados, se observó que el uso de pretratamientos no afectó significativamente la cuantificación del C_{bio}; sin embargo, sí la refrigeración de extractos. No se determinaron correlaciones significativas entre los métodos de determinación del C_{bio}. En cambio, el C_{bio} determinado con el analizador de C se mostró correlación con los otros parámetros mencionados anteriormente, demostrando su conveniencia de uso, a lo que se suma la rapidez de determinación, inocuidad para la salud humana y ser ambientalmente amigable.

Palabras Clave: Carbono de Biomasa Microbiana (C_{bio}), analizador de carbono TOC-L Shimadzu, maca (*Lepidium meyenii* Walpers), barbecho, pasto nativo, pastura.

ABSTRACT

Recently, active carbon fractions use has become more important as indicators for soil quality; due to its rapid response to agronomic management and strategies for soil conservation. For example, Microbial Biomass Carbon (MBC) stands out for its dynamism and short recycling time, evidencing changes in the system. commonly, its determination in Peru follows traditional methods, presenting problems of reliability, underestimation, long duration, health risks and environmental pollution. The objective of this investigation was to determine the feasibility of using the TOC-L Shimadzu carbon analyzer, under the working conditions of LASPAF-UNALM. The effect of pre-treatment of samples is a critical phase of processing; for this purpose, humidity adjustment, incubation and cooling of extracts prior to analysis was determined. Two traditional methods were compared with the use of the carbon analyzer using contrasting soils in the Highlands of Junín, (soils with maca cropland, fallow, native grassland and cultivated pasture). As well as other parameters such as: Total Carbon (TC), Total Organic Carbon (TOC), Total Nitrogen (TN), C: N ratio, COT: N ratio and the Soil Organic Carbon Stock. Results showed that, the use of pre-treatments did not significantly affect the quantification of MBC; however, refrigeration extracts had a positive effect. There were no significant differences between MBC determination methods. On the other hand, a significant statistic correlation was found between MBC and the previously mentioned parameters, which demonstrates MBC method convenience of use, and adds to the speed of determination, safety for human health and being environmentally friendly.

Keywords: Microbial Biomass Carbon (MBC), TOC-L Shimadzu carbon analyzer, maca cropland (*Lepidium meyenii* Walpers), fallow, native grassland, cultivated pasture.

I. INTRODUCCIÓN

En el ecosistema suelo, la Materia Orgánica del Suelo (MOS) está directamente relacionada a diferentes procesos químicos, físicos y biológicos. Puede ser dividida en: una fracción activa del C y N del suelo que consiste en microbios vivos y sus productos, junto con MOS con un corto tiempo de reciclaje (1-5 años); una fracción lenta que está físicamente protegida y/o en una forma química con más resistencia biológica a la descomposición, con un tiempo de reciclaje intermedio (20-40 años); y una fracción pasiva, químicamente recalcitrante y que puede estar físicamente protegida, con mayor tiempo de reciclaje (200-1500 años) (Parton *et al.* 1987). Son consideradas como fracciones activas, la Biomasa Microbiana del Suelo (BMS), materia orgánica oxidable en permanganato, materia orgánica soluble y materia orgánica particulada (Powlson *et al.* 1987).

El Carbono Orgánico del Suelo (COS) está contenido en la MOS, el cual es en su mayoría entre 50 a 60 % de su composición total. Una atención considerable en investigación se ha centrado en el COS, porque se ha modificado en gran medida a través de las actividades humanas, y se prevé que disminuya con el aumento de las temperaturas medias globales, con efectos adversos sobre las funciones, los procesos del suelo, la calidad y salud del suelo (Lal, 2004). La intensificación de la agricultura y las prácticas de manejo del suelo, ocasionada por ejemplo, por la conversión de terrenos de pastos nativos en cultivables y el sobrepastoreo, podría estar contribuyendo al aumento de emisiones de C a la atmósfera (Rolando *et al.* 2017).

Por otra parte, el manejo del suelo ocasionaría cambios mínimos en el contenido del CT medido a corto plazo (Prasad Datta *et al.* 2010). Por tanto, ante la necesidad de tener indicadores biológicos sensibles, muchos estudios se están volcando al análisis e interpretación de las fracciones lábiles, también llamado inestable. Por ello, el Carbono de Biomasa Microbiana (Cbio), una de estas fracciones, es considerado un indicador biológico referente y promisorio en la evaluación de calidad del suelo.

El suelo es producto de diversos factores a los que debe gran parte de sus características intrínsecas. Como parte de su estudio, es sometido a determinadas condiciones desde que es extraído, transportado y almacenado, todas estas actividades alterarían dichas características. Protocolos cotidianos y convenientes como el secado al aire y la molienda tienen efectos profundos en los atributos físicos, químicos y biológicos de los suelos. Un objetivo de toda investigación es reducir al mínimo la influencia de estas condiciones antes de realizar la determinación de interés; por ello, la presente investigación abordó en una primera etapa, aquellas actividades que desde su origen estarían afectando las propiedades del suelo. Estas actividades comprenden el muestreo, manejo (composición y reducción de muestra, contenido de humedad), almacenamiento previo a un análisis y de conservación de la muestra *a posteriori*. Seguido, se observó el efecto del pretratamiento de la muestra, aquel que normalmente es realizado a fin de uniformizar condiciones de un suelo y facilitar su procesamiento; éste comprende, por ejemplo, secado de muestra, ajuste de humedad e incubación. Luego, se probó la refrigeración de extractos obtenidos en una primera etapa de análisis, a corto y largo plazo; la cual comprendió suelos procedentes de Ancash, Ayacucho y Junín, en la cual se cuantificó el Cbio con el analizador de C, Carbono oxidable en Permanganato (COXP) y COT.

La investigación y referenciación de estudios en los componentes biológicos de los suelos del Perú es escasa y más aún su utilización como indicadores de la calidad del suelo. Los esfuerzos por analizar el Cbio en suelos del Perú resultan en puntuales contribuciones (Lao 2017; Chalco 2007), las cuales a su vez reportan métodos tradicionales de evaluación. Sin embargo, cabe destacar los alcances obtenidos por Lao (2017), que en función al contenido de fracciones de C orgánico, entre ellas, COXP, BMS y CT, evaluó cinco diferentes sistemas agroforestales, ubicados en la provincia de Alto Amazonas (Yurimaguas, Loreto, Perú). Así también, se describe en el trabajo de Ayala (2015), con el uso de la actividad microbiana como indicador del uso de biofertilizantes de bajo costo para lograr el establecimiento de las plantaciones forestales maderables de shihuahuaco (*Dipteryx alata* y *D. micranthra*) en suelos degradados. Por tanto, resulta necesario iniciar los trabajos de experimentación y la generación de una base de datos en cuanto al Cbio y otras fracciones lábiles de C.

Generalmente, se siguen métodos tradicionales, uno de ellos es por Fumigación-Incubación (FI), el cual fue ideado para suelos bien drenados, pH mayor a 4.8 y sin adición reciente de material degradable. Otra alternativa es el uso de Fumigación-Extracción (FE), el cual

resulta menos restrictivo, suponiendo además un menor tiempo en realizar el análisis. Posterior a la obtención de dicho extracto se analiza la muestra utilizando procesos de oxidación, por ejemplo, la metodología de Walkley - Black y modificaciones, hacen uso de la oxidación húmeda y titulación, siendo de bajo costo pero altamente riesgoso y contaminante.

Por otro lado, en la actualidad se vienen utilizando analizadores de C (p. ej., TOC-L Shimadzu) que hacen uso de la oxidación catalítica por combustión y detección por infrarrojo no dispersivo (NDIR), el cual mide cantidades de CT, Carbono Inorgánico (CI) y COT en una solución líquida. Acorde a su diseño, el analizador de C TOC-L Shimadzu puede ser usado en la determinación del Cbio presentando alta sensibilidad de detección y mayor eficiencia de trabajo.

Se realizaron determinaciones de Cbio con tres métodos: FI con titulación (CbioI), FE con oxidación húmeda (CbioWB) y FE con oxidación catalítica por combustión (CbioS); a fin de establecer correlaciones entre los métodos, para ello se eligieron muestras correspondientes a suelos altoandinos de Junín con diferentes usos actuales de tierra (UAT): con cultivo de maca (*Lepidium meyenii* Walpers), suelo en descanso o barbecho, pastos nativos y pasturas cultivadas.

En los suelos mencionados, se realizaron determinaciones de otros parámetros, tales como, CT, COT, COS Stock, NT, tasas C:N y COT:N en los UAT, realizándose un Análisis de Componentes Principales (ACP) y estableciéndose correlaciones con el Cbio obtenido con las diferentes metodologías, a fin de obtener una validación del método nuevo.

Se propone como alternativa la utilización del TOC-L Shimadzu, un analizador de C que utiliza la oxidación catalítica por combustión y detección mediante NDIR para una determinación rápida, segura y ambientalmente amigable del Cbio. La demanda de estimaciones fiables de Cbio en un amplio rango de suelos, da lugar a una mejora analítica, resultando necesario validar la metodología y realizar las estandarizaciones necesarias.

Por tanto, los objetivos de la presente investigación fueron los siguientes:

Objetivo general:

Determinar la factibilidad del empleo del analizador de carbono TOC-L Shimadzu para la determinación del Cbio en muestras de suelo bajo las condiciones de trabajo del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina (LASPAF-UNALM).

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de los pretratamientos de humedad e incubación efectuados a la muestra de suelo y la refrigeración de los extractos, sobre el resultado de Cbio obtenido en el analizador de carbono (TOC-L Shimadzu).
- Comparar métodos de determinación del Cbio tradicionales y aquel que emplea el analizador de carbono, en suelos contrastantes en cuanto a propiedades fisicoquímicas y de cultivos asociados (UAT).
- Comparar los resultados de Cbio obtenidos y la relación con los parámetros Carbono Total (CT), el Carbono Orgánico Total (COT), el Nitrógeno Total (NT), las tasas C:N, COT:N y el Stock del Carbono Orgánico (COS Stock).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL CONTENIDO DE CARBONO COMO INDICADOR DE CALIDAD DE SUELOS

La reserva de CT en los sistemas terrestres se estima en alrededor de 3170 gigatoneladas (1Gt = 1 petagramo = 1 billón de toneladas métricas), de los cuales 2500 Gt se encontrarían en el suelo, 560 Gt en la biomasa de plantas y 110 en la biomasa microbiana. Cabe resaltar que 38000 Gt se encuentran en los océanos (Figura 1) (Jansson *et al.*, 2010).

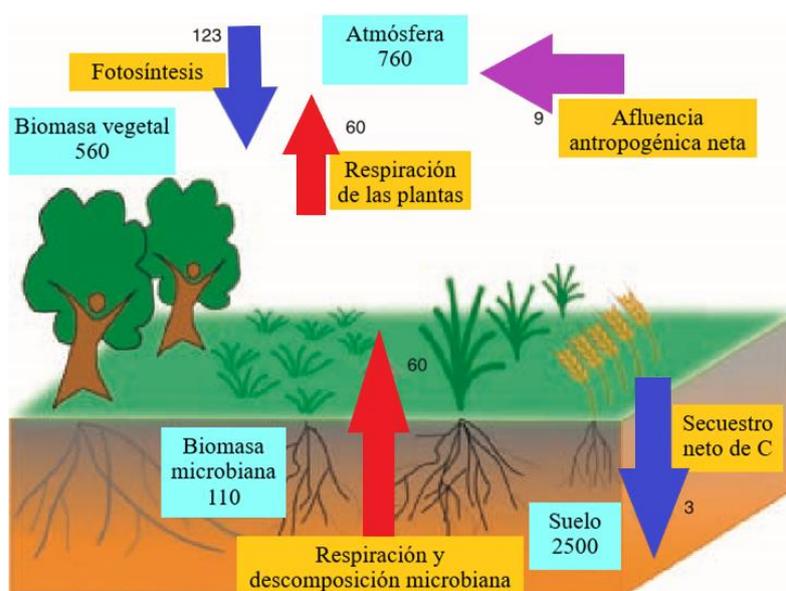


Figura 1: Ciclo del carbono. Las reservas de C (cajas celestes) se muestran en gigatoneladas (Gt). Los flujos de C (cajas amarillas) se muestran en Gt por año. FUENTE: Jansson *et al.* (2010).

El COS es la fuente de energía de la actividad microbiana y de la planta, todo esto en asociación con el aporte continuo de la MOS, contribuyendo al ciclaje y disponibilidad de los nutrientes (Ziqun *et al.*, 2008). Dadas condiciones naturales, el COS es el resultado del balance dinámico entre la incorporación de material vegetal muerto y la pérdida por descomposición.

Larson y Pierce (1991) establecieron el concepto de *Minimum Data Set* (MDS) o conjunto mínimo de datos, el cual considera indicadores físicos, químicos y biológicos sensibles al manejo del suelo, haciendo posible determinar de forma rápida la calidad de este. Los indicadores propuestos fueron: disponibilidad de nutrientes, carbono orgánico total, carbono orgánico lábil, textura, capacidad de almacenamiento de agua disponible para la planta, estructura del suelo, resistencia del suelo a la compactación, profundidad máxima de raíces, pH y conductividad eléctrica.

Por otro lado, las metodologías para estudiar los almacenes de C en el suelo y particularmente en condiciones de agricultura y forestería de laderas, son escasas. Un problema que cada vez es más evidente en el ámbito científico son las dificultades que se tienen para comparar resultados de captura de C en el suelo e integrar bases de datos confiables, debido a las diferencias en la forma en cómo se hacen las mediciones (Acosta *et al.* 2001).

La cantidad de COS estaría determinada por el contenido de N del suelo, al ser retenido en el suelo por los microorganismos, la lignina y la arcilla presentes, el C disminuirá hasta encontrarse en una relación constante (Fuentes y González 2007).

Según Ecclesia *et al.* (2012), en la fracción de suelo relacionada al limo y la arcilla, las tasas C:N permanecerían constantes después de un reemplazo de vegetación, dada la relativa constante estequiométrica del C:N en esta fracción. Así también, se esperaría que cambios a largo plazo en el COS Stock estén vinculados a dicha fracción.

La acción microbiana puede mineralizar o inmovilizar el N. Los microorganismos lo utilizan para construir sus propias estructuras y como fuente de energía, lo cual se conoce como inmovilización. Al incorporar rastrojo o agregar abonos orgánicos, se produce un decaimiento del contenido de N inorgánico de la solución del suelo, ya que los microorganismos lo requieren para aprovechar la energía contenida en los restos orgánicos y sintetizar sus propias estructuras. Por ejemplo, pajas de cereales con relaciones C:N de 60-100/1 deben transformarse en estructuras microbianas con relaciones de 8-12/1, es decir, deben enriquecerse en N. La inmovilización desaparecerá a medida que las poblaciones microbianas disminuyan a causa de la degradación de la fuente energética (Pellegrini 2017).

2.2 MUESTREO, MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE SUELO PARA DETERMINACIÓN DE CBIO

2.2.1 Generalidades

Los procedimientos de muestreo con fines de análisis microbiológico son similares a los empleados para análisis químico, con precauciones adicionales para evitar la contaminación de la muestra, adicionalmente, se debe tener en consideración que la población más activa metabólicamente y en mayor cantidad se encuentra en los primeros centímetros del perfil de suelo, donde se encuentra la capa arable. En los estudios microbiológicos se recomienda una profundidad de muestreo de 0-20 cm, la utilización de pala y no barreno para no disturbar el perfil original del suelo (FCA 2015).

Según el SAG (2012), el tipo de muestra de suelo debe corresponder a muestras compuestas, la cantidad de submuestras que componen la muestra debe oscilar entre 20 y 25 submuestras; así también, variará según el tipo de suelo, y sus características físicas y químicas.

Por otro lado, el manejo de la muestra resulta determinante, incluso para pruebas de fertilidad del suelo para P y metales pesados, que pueden verse afectadas por diferencias sutiles en el manejo. Sin embargo, se considera apropiado remover los guijarros, mayores al tamaño de malla requerido; raíces y desechos orgánicos, al ser considerados efímeros para el suelo (Carter y Gregorich 2008).

Según el tipo de análisis, se tendrá un método de almacenamiento. Por ejemplo, la refrigeración a 4-5 °C es utilizada para la evaluación de parámetros biológicos, y el almacenamiento de muestras oreadas y tamizadas es por mínimos períodos de tiempo, no mayores a un mes. El almacenamiento de muestras húmedas por largos períodos de tiempo no es recomendable porque posiblemente ocurran cambios en la comunidad de microorganismos y el desarrollo de condiciones anaeróbicas. Sin embargo, la congelación entre -20 y -80 °C normalmente se utiliza para análisis biomoleculares o para determinar la diversidad genética de las comunidades microbianas, siendo adecuada para el almacenamiento por largos períodos de tiempo dado que la actividad microbiana se minimiza de forma efectiva. La temperatura ambiente (25 °C) sólo es indicada para la evaluación de parámetros químicos y/o físicos (FCA 2015).

2.2.2 Muestreo de suelos

A continuación, se precisan algunas definiciones (CORPOICA 2013):

- Muestra: Porción de material seleccionado de una cantidad mayor de material.
- Mezcla: Combinación de componentes, partículas o capas en un estado más homogéneo.
- Muestra representativa o submuestra: Muestra resultante de un plan de muestreo del cual se espera refleje adecuadamente las propiedades químicas, físicas y microbiológicas de interés de un terreno homogéneo. Cada submuestra debe ser tomada siguiendo el mismo procedimiento en cuanto a instrumento utilizado, profundidad, etc. Además, deben ser independientes y no presentar interacción.
- Muestra compuesta de suelo: Mezcla de varias muestras representativas. Deben ser homogéneas, cada submuestra debe contribuir de igual manera (mismo volumen) a la muestra compuesta.
- Muestreo: Proceso utilizado para extraer o constituir una muestra de suelo o muestra compuesta de suelo.
- Área homogénea de terreno: Área que presenta características similares en toda su extensión, en cuanto a color, textura, relieve, manejo del terreno, entre otros.

2.2.3 Diseño de muestreo

El diseño de muestreo define la forma y el número de muestras a tomar, debe tomarse una muestra por cada porción de terreno con características particulares. Los diseños pueden ser asistemáticos o sistemáticos, en ambos casos el punto inicial y/o su orientación deben ser tomados aleatoriamente. Los diseños asistemáticos no tienen diseño especial y los diseños sistemáticos, se puede realizar recorriendo la parcela o lote en cuadrículas, zigzag o diagonales, o sobre el trazo de un transecto lineal. El transecto es una línea recta imaginaria con puntos de muestreo localizados a intervalos regulares (Figura 2) (FCA 2015).

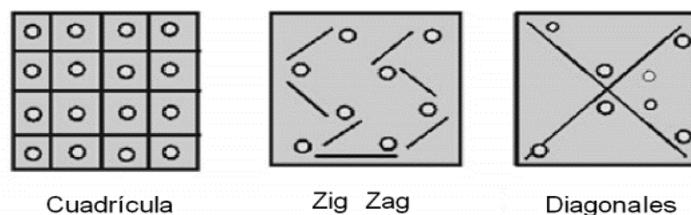


Figura 2: Tipos de diseños de muestreo sistemáticos
FUENTE: FCA (2015).

Según Carter y Gregorich (2008), se presentan los siguientes diseños de muestreo:

a. Muestreo de terrenos sin pendiente o con una pendiente reducida

El no presentar desniveles marcados supondría una menor variabilidad del terreno, por lo que el muestreo puede realizarse en transecto o cuadrícula (Figura 3A).

b. Muestreo de terrenos con pendientes pronunciadas

El diseño va a depender de la curvatura del plano. Donde no exista una curvatura significativa a través de la pendiente, se suele realizar el muestreo en un solo transecto a través de ella (Figura 3B). Sin embargo, con una curvatura de plano significativa, un único transecto no sería suficiente; pueden utilizarse transectos orientados aleatoriamente en zigzag o múltiple, pero siendo común un diseño en cuadrícula. La flecha orientada cuesta abajo delimita la longitud de la pendiente a lo largo del eje de la red, y la flecha a través de la pendiente indica la longitud mínima del eje de la red (Figura 3C).

Es importante asegurar que todos los elementos de la pendiente estén representados en la cuadrícula. Ésta debe extenderse desde la cima de la pendiente hasta el final, a lo largo del eje de la pendiente y a lo largo de al menos una secuencia completa de convergencia y divergencia a través de la misma.

La distancia entre los puntos de muestreo en transecto o cuadrícula debe ser menor que la distancia requerida para representar la variabilidad en el campo. Por ejemplo, si el área de estudio contiene accidentes geográficos cuyas cimas y fondos están igualmente espaciados a 30 m, un transecto que cruce estos accidentes geográficos debe tener ubicaciones de muestreo mucho más cortas que ésta (5 a 10 m). El espaciamiento de la muestra debe establecerse en pro del conocimiento del área.

c. Muestreo de terrenos agrícolas

Para los terrenos agrícolas se puede usar un diseño en cuadrícula o con un punto de referencia, de forma aleatoria. El diseño en cuadrícula es el de mayor costo, pero puede proveer información altamente detallada sobre la distribución de variabilidad de nutrientes si el tamaño de la cuadrícula es lo suficientemente pequeña.

Para el caso de diseño con un punto de referencia o *benchmark*, el lugar debe ser de 1000 m² o de un cuadrado de 30 x 30 m aproximadamente, pudiéndose tomar 20 o más muestras aleatoriamente dentro del punto de referencia. La principal ventaja de este diseño es que los cambios año a año son reflejados con mayor exactitud.

La aleatoriedad se puede generar con un GPS o con un patrón de muestreo zigzag, el más usado (Figura 3D).

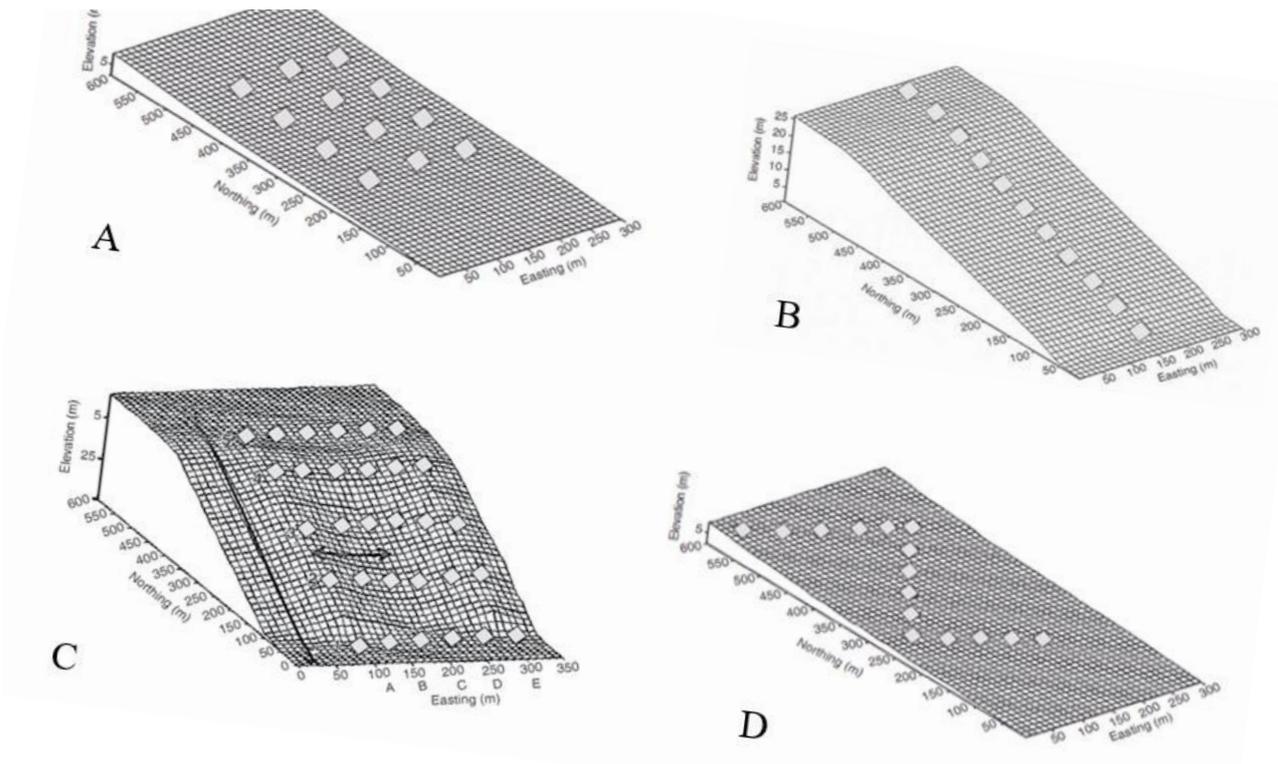


Figura 3: Diseños de muestreo. (A) En cuadrícula, compuesta por cuatro transectos paralelos en una superficie nivelada. (B) Con transecto en una superficie inclinada a través de la pendiente. (C) En cuadrícula, compuesta por seis transectos paralelos sobre una superficie inclinada a través la pendiente. (D) Muestreo en zigzag.

FUENTE: Carter y Gregorich (2008).

2.2.4 Proceso de muestreo

En los análisis de campos agrícolas, generalmente las muestras tomadas, sea cual sea el diseño, son combinadas y una muestra compuesta es analizada. La muestra compuesta significa un menor costo; sin embargo, no otorga evaluación de la variabilidad del campo y depende de la habilidad humana a fin de identificar las secciones del terreno que puedan tener niveles nutricionales diferentes. Se sugiere que alrededor de 20 submuestras deben ser

colectadas de cada terreno o subsección de terreno, independientemente del área involucrada (Carter y Gregorich 2008).

Para el proceso de muestreo se recomienda seguir las siguientes consideraciones (SAG 2012, CORPOICA 2013, SENA 2013, FCA 2015):

- En el sitio seleccionado se debe limpiar la superficie con la pala, para quitar el material vegetal, entre otros.
- Se realiza un hoyo con la pala, de acuerdo con la profundidad establecida, este hoyo puede ser cuadrado o en V, para facilitar la toma de la muestra.
- Se toma la submuestra de la pared del hoyo, debido a que se quiere representar la profundidad escogida de acuerdo con el cultivo, si se toma del fondo del hoyo, se estaría tomando una submuestra inadecuada de la profundidad deseada; así también, se debe eliminar bordes para evitar contaminación.
- Se coloca la submuestra en un balde o bandeja, y se mezcla tratando de homogeneizarla, preferiblemente usando guantes. Los anteriores pasos se repiten para el número de submuestras seleccionadas para el lote.
- Cada submuestra debe contribuir por igual (mismo volumen) a la muestra compuesta; debe ser tomada siguiendo el mismo procedimiento en cuanto a instrumento utilizado, profundidad, etc.; siendo independientes y no presentar interacción.
- Se debe colocar en doble bolsa de plástico limpia y refrigerar inmediatamente.
- Para muestras compuestas que superen el peso requerido, se utiliza la técnica de los cuartos opuestos para fraccionamiento, donde se homogeniza la muestra inicial, se extiende y descartan los cuartos opuestos, repitiendo el procedimiento tantas veces como sea necesario para la obtención del peso requerido de la muestra compuesta (1 kg).
- No se deben tomar muestras de los siguientes lugares: al pie de las cercas, zanjas, canales, caminos o cortes de carretera; lugares de acumulación de materiales vegetales o estiércol; donde haya habido quemas recientes; zonas muy pantanosas o de acumulación de sales; tampoco se deben mezclar muestras de diferentes lotes.

- Al tomar muestras de un campo que ha sido fertilizado recientemente, no se debe tomar de los sitios en donde los fertilizantes fueron aplicados.

2.2.5 Manejo y almacenamiento

A continuación, se describen algunos atributos típicos en cuanto al manejo y almacenamiento según el analito de interés (Cuadro 1):

Cuadro 1: Atributos típicos para manejo y almacenamiento de muestras de suelo.

Analito	Composición y reducción del tamaño de muestra	Humedad	Almacenamiento previo al análisis	Almacenamiento de conservación
Fauna del suelo: Lombrices, nemátodos, otros invertebrados.	Evitada, generalmente utiliza núcleos o terrones de suelo poco disturbados.	Humedad de campo.	Tiempo mínimo, refrigerada, no congelada.	Imposible para analitos primarios, adecuado para algunas mediciones auxiliares.
Actividades microbianas: Respiración, ensayos de funcionalidad.	Muestras puntuales o compuestas poco disturbadas.	Humedad de campo o de trabajo.	Tiempo mínimo, refrigerada, no congelada.	Imposible para analitos primarios, adecuado para algunas mediciones auxiliares.
Poblaciones microbianas: Enumeración, tipos de población.	Necesidad de condiciones asépticas, a menudo con muestras puntuales no compuestas.	Humedad de campo o de trabajo.	Tiempo mínimo, refrigerada, no congelada.	Imposible para analitos primarios, adecuado para algunas mediciones auxiliares.
Atributos microbianos: <i>PFLA</i> , ADN	Muestras puntuales o compuestas poco disturbadas.	Humedad de campo o de trabajo.	Varía con el tipo de análisis, el congelamiento puede ser apropiado.	Varía con el analito, congelamiento a temperaturas extremas (-80 °C) puede ser adecuado.
Materia orgánica del suelo: Estructura, composición	Molienda moderadamente agresiva puede ser aceptable.	Varía con el análisis, puede incluir secado en estufa.	Varía con el análisis	Varía con el análisis

... Continuación

Biodisponibilidad y especiación química	Molienda moderadamente agresiva puede ser aceptable.	Contenido de humedad de trabajo	Tiempo mínimo, refrigerado puede ser ideal.	Imposible para analitos primarios, adecuado para algunas mediciones auxiliares.
Propiedades físicas: Distribución del tamaño de poro, densidad aparente.	Evitada, generalmente utiliza núcleos o terrones de suelo poco disturbados (muestras puntuales, no compuestas).	Humedad de campo o de trabajo, pero los resultados reportados en base a un secado en estufa.	Indefinido si es refrigerada, puede cambiar al congelarse.	Indefinido si es refrigerada, puede cambiar al congelarse.
Mineralógico	Molienda agresiva aceptable, mientras que los granos no sean aplastados.	Generalmente reportado sobre la base de un secado a estufa	Indefinido en estado seco.	Indefinido en estado seco.
Física: Granulometría, contenido de materia orgánica total	Molienda agresiva aceptable, mientras que los granos no sean aplastados.	Generalmente reportado sobre la base de un secado a estufa	Indefinido en estado seco.	Indefinido en estado seco.
Análisis elemental: Total y extractable con ácidos fuertes.	Molienda agresiva aceptable.	Generalmente reportado sobre la base de un secado a estufa	Indefinido tanto como la contaminación sea evitada.	Indefinido tanto como la contaminación sea evitada.

FUENTE: Carter y Gregorich (2008).

a. Composición y reducción del tamaño de muestra

La composición y reducción debe asegurar que la muestra representará al todo. La composición involucra reunir y mezclar una serie de muestras individuales, representando un material uniforme de una serie de puntos de muestreo a través del paisaje. Como regla general, si la muestra compuesta que se requiere es 1 kg de suelo, un tamaño de muestra reducida podría ser ~5 g (5 cm³) o menos. Si se requiere 0.5 g, la muestra debería ser molida más finamente (Carter y Gregorich 2008).

Respecto al análisis de C_{bio} y su afectación, Gonçalves *et al.* (2002) hallaron que el acondicionamiento de las muestras en forma de tierra fina seca al aire (TFSA) no mostró diferencias significativas en C_{bio} en comparación con las muestras sin preparación. Sin embargo, hace la recomendación de que el manejo debe ser analizado para cada tipo de muestra cuando se evalúa la respiración basal; así también, estudios previos muestran que la molienda afecta las tasas de mineralización microbiana en el suelo (Craswell y Waring 1972).

Por otro lado, la eficacia del cloroformo en la lisis de los microorganismos del suelo depende de un gran número de propiedades físicas, químicas y microbiológicas, tales como la porosidad, la textura, la superficie específica, la capacidad retentiva de humedad (la solubilidad del cloroformo en agua es 8 g L⁻¹ a 20 °C), el contenido de arcilla expandible, la composición de la comunidad microbiana y la fase de crecimiento de los microorganismos. Así, la eficiencia del cloroformo en la lisis de bacterias se incrementó de 81.9 % en suelos no disturbados a 89.1 % en suelos tamizados (Lynch y Panting 1980).

b. Contenido de humedad de la muestra

Tal como señalan Carter y Gregorich (2008), el contenido de humedad de las muestras almacenadas afectaría los resultados de los análisis de forma considerable. Un parámetro que considerar de cuánto secar una muestra, es que los suelos en su lugar de origen son usualmente objeto de procesos de humedecimiento y secado, es así que el secado en laboratorio a contenidos de humedad que pueden ser encontrados en campo puede ser justificado para varios analitos.

El secado de un suelo ocasiona un número de reacciones, los organismos vivos pasan a un estado dormante o de muerte. Los materiales inorgánicos disueltos se volverían más concentrados en el agua de poro remanente, y finalmente formarían precipitados o materiales en fase de gel. Los materiales orgánicos disueltos probablemente coagulen, también por volverse más concentrados y porque la concentración de sales del poro de agua se incrementa. Los materiales sólidos orgánicos se deformarían al secarse, descubriendo superficies minerales subyacentes.

Para ensayos biológicos, microbianos y enzimáticos, el secado debería ser evitado o restringido a un contenido de humedad con el que se pueda trabajar. El grado de recuperación y tiempo para el restablecimiento de la población microbiana y sus funciones difieren según los suelos y grupos microbianos.

c. Almacenamiento previo al análisis

Los análisis de atributos biológicos o actividades mediadas biológicamente, y cualquier análisis de componentes volátiles o lábiles requieren un tiempo de almacenamiento máximo, condiciones de temperatura específicas, contenido de humedad y tipo de contenedor. Análisis de compuestos nitrogenados y compuestos orgánicos sujetos a biodegradación son especialmente aquellos en los que las condiciones de almacenamiento son críticas (Stenberg *et al.* 1998).

La temperatura apropiada para almacenamiento de muestras de suelo requeridas para determinación de parámetros microbiológicos, incluido el potencial para degradar contaminantes, es motivo de controversia. Stenberg *et al.* (1998) mencionan ser aceptable almacenar suelos para el análisis de microbiota a -20 °C, si los suelos provienen de áreas donde normalmente están congelados en invierno.

Algunas pautas de prueba que miden la actividad microbiana (p. ej., OCDE 2000) concuerdan en que si los suelos son recolectados de áreas donde están congelados por al menos tres meses del año, se puede considerar el almacenamiento a -18 °C durante seis meses. Sin embargo, otros autores señalan que el suelo congelado provoca cambios significativos y a largo plazo en la abundancia y actividad microbiana y que ciertos grupos

son particularmente sensibles a los efectos de la congelación (Zelles *et al.* 1991; Shishido y Chanway 1998; Pesaro *et al.* 2004).

Daglio *et al.* (2005) observaron el efecto del almacenamiento por refrigeración y por congelación sobre el C y N de la biomasa microbiana, no encontrando en general diferencias significativas en la comparación con muestras frescas, y en el caso del N se encontró una variación de $\pm 7\%$ en muestras refrigeradas a 4 °C. Concluyendo que la mejor alternativa era la refrigeración a esta temperatura.

Por otro lado, otros ensayos microbianos (p. ej., PFLA *phospholipid fatty acid*), requieren por lo general que las muestras sean mantenidas en un estado congelado para minimizar la degradación de los ácidos grasos durante el almacenamiento (Carter y Gregorich 2008).

d. Almacenamiento de conservación

Riepert y Felgentreu (2002) mencionan que mantener el suelo como un estándar de laboratorio, en condiciones de secado al aire y durante un largo período de tiempo, no es adecuado debido al componente microbiano, lo cual también se relaciona con la mineralización de N.

2.3 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y REFRIGERACIÓN DE EXTRACTOS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE CBIO

2.3.1 Contenido de humedad e incubación

El pretratamiento de muestras consiste en realizar ajustes de humedad, seguidos de incubación a una determinada temperatura, se realiza con la finalidad de reactivar el metabolismo de la población microbiana presente en los suelos. De esta forma, se acondicionan las muestras antes de un análisis, el tiempo de incubación varía de 3 a 28 días, la temperatura de 12 °C a 22 °C o la del medio ambiente, y la humedad de 30 a 60 % de su capacidad de retención de agua (Bao *et al.* 2016).

Sin embargo, Riepert y Felgentreu (2002), no observaron diferencias significativas entre suelo utilizado después de un período de tiempo y suelo fresco, cuando las condiciones de pretratamiento fueron las adecuadas para mantener la actividad microbiana.

Por otro lado, Gonçalves *et al.* (2002), indican que el secado puede tornar la materia orgánica más accesible a la descomposición, además del contenido de los microorganismos muertos, siendo atacados prontamente después del rehumedecimiento. Se ha documentado que el secado y rehumedecimiento de los suelos aumenta la mineralización de C y N durante la incubación húmeda, deduciéndose que el origen de este aumento es la biomasa muerta por el secado y residuos orgánicos no vivos. Además, se especula la influencia de las propiedades del suelo como el contenido de C y la textura (Van Gestel *et al.*, 1993). Fierer y Schimel (2002), señalan cambios significativos en la dinámica del C y N microbiano y estos efectos pueden durar más de un mes después del último estrés. Las tasas de mineralización, aumentos de C y N, se dan generalmente algunos días después del rehumedecimiento de un suelo seco.

Pesaro *et al.* (2004) manifestaron que el contenido de ADN y conteo directo de células disminuyó pronunciadamente después del secado y rehumedecimiento, encontrándose similar tendencia con el congelado y deshielo, pero siendo mayor en el primero.

Según Gonçalves *et al.* (2002), el acondicionamiento de corta duración de las muestras, procediéndose a una fumigación para análisis de Cbio, después de 24 o 72 horas de rehumedecimiento, se mostró viable para la mayoría de los suelos evaluados. El efecto del rehumedecimiento en el Cbio dependería de la clase de suelo, siendo el uso de 25 a 75 % de la capacidad máxima de retención de agua viable para la mayoría de las evaluaciones.

Valores altos de Cbio encontrados luego del rehumedecimiento de muestras pueden ser recurrentes por el flujo de actividad de la biomasa del suelo en el reservorio de la MOS, que se encuentra sujeto a pronta mineralización (Franzluebbers *et al.* 1996). La disminución de humedad en el ambiente externo acarrea aumento en la concentración de solutos intracelulares y, con el suelo muy seco puede provocar el rompimiento y muerte de las células microbianas (Kieft *et al.* 1987).

Ross (1987) encuentra valores significativamente bajos de CO₂-C, N mineral, kC y kN en suelos humedecidos y compactados, generalmente por el impedimento de mineralización, obteniendo que con múltiples fases de secado y rehumedecimiento la concentración de NO₃⁻ disminuye.

En cuanto a la efectividad del cloroformo en suelo húmedo, Witt *et al.* (2000) señalan que, a pesar de la baja solubilidad del cloroformo en agua, demuestra ser un biocida altamente efectivo cuando se fumigó suelo saturado, confirmando estudios previos de Inubushi *et al.* (1991); el cloroformo añadido a suelo saturado causó significativos y consistentes incrementos en C y N extractable. El contenido de agua en el suelo no influyó la eficiencia de la fumigación por sí misma.

2.3.2 Refrigeración de extractos y uso de Sulfato de Potasio (K₂SO₄)

Diferentes agentes extractantes han sido usados para las mediciones de C de la biomasa, 0.5 M K₂SO₄ (Vance *et al.* 1987), 0.05 M K₂SO₄, 2 M KCl (Joergensen y Brookes 1991) y 0.25 M K₂SO₄ (Zagal 1993).

Tal como señalan algunos autores (Brookes *et al.* 1985; Vance *et al.* 1987; Wu *et al.* 1990; Joergensen 1996), la extracción de C de la biomasa con 0.5 M K₂SO₄ posee algunas ventajas:

- El método es calibrado con 0.5 M de K₂SO₄.
- La alta concentración de K floccula el suelo y previene la adsorción de amonio, el cual es liberado por la fumigación.
- La relativamente alta concentración de sal también inhibe la descomposición microbiana después de la fumigación.
- El C y N microbiano pueden ser analizados en el mismo extracto.

Sin embargo, la solución de K₂SO₄ puede causar algunos problemas analíticos:

- Un precipitado blanco aparece durante el almacenamiento de los extractos de suelo con 0.5 M K₂SO₄, especialmente si las muestras son congeladas.
- La solubilidad de las sales puede incrementarse o disminuir con la temperatura, la magnitud de esta dependencia varía ampliamente entre componentes. El K₂SO₄ posee una baja solubilidad, y a medida que la temperatura disminuye se hace aún menor (Figura 4) (Silberberg 2012).

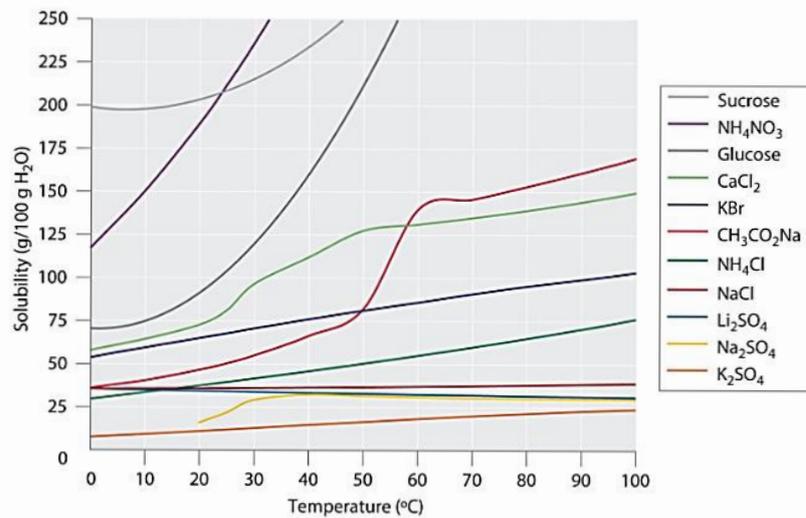


Figura 4: Solubilidad de sólidos orgánicos e inorgánicos en agua, en función de la temperatura. FUENTE: Silberberg (2012).

2.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CBIO

2.4.1 Generalidades

Los cambios inducidos por el manejo en el estado de la MOS, ocurridos en períodos cortos de tiempo (1 a 5 años) son difíciles de medir debido a la gran cantidad presente de material relativamente estable en el suelo (Gregorich *et al.* 1994). Sin embargo, por su naturaleza dinámica, las fracciones lábiles de la MOS pueden responder rápidamente a los cambios. Tales componentes han sido sugeridos como indicadores tempranos de los efectos del manejo del suelo (Pankhurst *et al.* 1995; Haynes 1999; Haynes 2000). Por ejemplo, la fracción viva de la MOS, la BMS, tiene una tasa de recambio de 1 a 2 años y representa de 1 a 5 % del total, siendo una reserva de nutrientes. Es considerada una fracción muy lábil que fluctúa con la estación y que también responde rápidamente a los cambios de manejo del suelo (FAO 2002; Jenkinson y Ladd 1981).

La BMS es un agente catabólico de procesos biogeoquímicos y también un reservorio de energía y nutrientes, determina el equilibrio de la productividad del ecosistema, ya que es un medio de transformación de todos los materiales orgánicos del suelo. La estimación de este parámetro contribuye al conocimiento del estado de la calidad y fertilidad del suelo, y su mantenimiento en el tiempo (Pankhurst *et al.* 1995; Fliebbach y Mäder 2000; Haynes 2000).

Los métodos para el análisis de la BMS pueden ser divididos en directos, por ejemplo, microscopía o ácidos grasos específicos de la membrana de fosfolípidos (PFLAs) e indirectos, tales como, fumigación con cloroformo (FE/FI) o Respiración Inducida por Sustrato (RIS) (Nielsen y Winding 2002). Los métodos representan actividades potenciales sólo porque el suelo es incubado bajo condiciones óptimas de sustrato, temperatura, pH y humedad, las cuales no ocurren en condiciones *in situ* (Nannipieri *et al.* 2003).

Perie y Ouimet (2008) refieren lo crítico de la selección del protocolo para la exactitud de la cuantificación de COS y su cambio en el tiempo. El cloroformo actúa sobre los microorganismos en el suelo, y el tamaño de la biomasa muerta es estimado por cuantificación de dióxido de carbono (CO₂) respirado por un período de incubación especificado (FI) o por una extracción directa del suelo después de la fumigación, seguida por una cuantificación del C extractable (FE).

Entre otros métodos indirectos se tiene el de RIS, este método sólo cuantifica la porción metabólicamente activa de la BMS, es decir, el cambio inicial en la tasa de respiración del suelo como resultado de añadir un sustrato de fácil descomposición, como glucosa (Carter *et al.* 1999; Anderson y Domsch, 1978). La BMS es calculada utilizando un factor de conversión (Kaiser *et al.* 1992).

El método más tradicional fue propuesto por Rogers y Rogers en 1848 y plantea la utilización de la mezcla de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y dicromato (K₂Cr₂O₇) para la oxidación húmeda de materiales orgánicos. Posteriormente, se utilizó para la oxidación húmeda de COS propuesta por Schollenberger (1927), Walkley y Black (1934) y Tiurin (1935).

Los métodos de oxidación con K₂Cr₂O₇ para el COS, se dividen en dos grupos. Uno de ellos no emplea calor externo y el otro lo provee durante el proceso de oxidación. Siendo este último el más popular y ampliamente seguido por su rapidez y bajo costo (Walkley y Black 1934; Nelson y Sommers 1996).

Otro método para la determinación de COS es el de oxidación catalítica por combustión en analizadores elementales automatizados. El COS es oxidado y determinado como CO₂ (Högberg y Högberg 2002).

2.4.2 Procedimiento de fumigación por cloroformo para la determinación del Cbio

La fumigación con cloroformo es un método indirecto comúnmente utilizado. En principio realiza una lisis celular microbiana y se considera como un método capaz de medir la mayor cantidad de biomasa microbiana del suelo, aunque algunos microorganismos, como las esporas, son insensibles al proceso de fumigación (Toyota *et al.* 1996). Se tienen dos vías para su determinación:

a. Método de Fumigación - Incubación (FI)

La constante kC , representa la fracción de biomasa muerta convertida a CO_2 durante un período de incubación de 10 días. Los valores de kEC , kEN y kEP son derivados de medidas hechas en una pequeña selección de organismos añadidos al suelo y fumigados. Estos organismos, que crecen en medios ricos en nutrientes, podrían no ser buenos modelos para suelos pobres y de población diversa. Algunos autores calculan el kC con un sustrato marcado como ^{14}C , por ejemplo, glucosa que se deja descomponer por uno o dos días y luego se fumiga; sin embargo, se asume que el ^{14}C insoluble está presente como biomasa microbiana viva. El factor puede ser utilizado en suelos aeróbicos superficiales sin mayor error dadas las similitudes en contenido de ATP (alrededor de $11 \mu\text{mol ATP g}^{-1} \text{C biomasa}$ o la forma en que el biovolumen está distribuido entre los pequeños y grandes organismos en suelos diferentes (Vance *et al.* 1991; Contin *et al.* 2001, Jenkinson *et al.* 2004).

En el caso de suelos con enmiendas orgánicas, por ejemplo, raíces, restos vegetales o fertilizantes orgánicos, se tienen considerables fallas puesto que se obtienen valores bajos o incluso negativos, siendo inadecuado para las mediciones de C y N (Ocio y Brookes 1990; Martens 1995). Al respecto, Shen *et al.* (1987) recomiendan la pre-incubación del suelo sumada al uso de la muestra no fumigada desde los días 0 a 10 como control.

b. Método de Fumigación - Extracción (FE)

La FE permite estimar C, N, P, S y puede ser usada en suelos con pH ácido, inclusive después de la adición de sustratos. La ventaja de este método es que los compuestos liberados desde el suelo fumigado provienen principalmente de la BMS, más que de otras fuentes de C y N (Carter 1991).

Alessi *et al.* (2011) mencionan que es posible la utilización del método de FE para muestras pobres en arcilla, con arena de sílice o acuíferos subterráneos que también contengan ácidos húmicos y/o bacterias. El método resulta más adecuado que el FI para suelos con bajo pH o materiales orgánicos degradables, siendo también usado para suelos anegados (Inubushi *et al.* 1991).

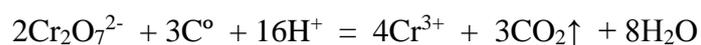
A partir de la obtención del extracto la medición del C puede ser realizada por oxidación húmeda ($K_2Cr_2O_7$) u oxidación catalítica por combustión (analizador de C). Al respecto, Wu *et al.* (1990), señalaron que la oxidación con $K_2Cr_2O_7$ no era completa, lo cual es consistente con el hecho de que las moléculas orgánicas complejas no pueden ser completamente oxidadas con $K_2Cr_2O_7$.

Procedimiento de Oxidación Húmeda

Este procedimiento, propuesto originalmente por Schollenberger (1927), implicaba la oxidación de la materia orgánica con ácido crómico, que se genera mezclando $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 con el suelo, y calentando la mezcla a 175 °C durante dos minutos. Después que se enfriaba la mezcla se titulaba el $K_2Cr_2O_7$ remanente con sulfato ferroso amónico. El mismo autor propuso, posteriormente, la adición de fluoruro de sodio o ácido fosfórico para eliminar la interferencia del hierro (II).

Walkley y Black (1934) modificaron la técnica de Schollenberg provocando la oxidación de la materia orgánica sólo con el calor de la reacción que se genera al mezclar el ácido sulfúrico concentrado y la solución de $K_2Cr_2O_7$. En el método de Walkley-Black (WB) tradicional, se agrega $K_2Cr_2O_7$ a la muestra pulverizada en un matraz, luego se mezcla y agrega H_2SO_4 rápidamente, mezclando nuevamente y dejando reposar durante 30 minutos. Posteriormente, se añade agua desionizada y unas gotas del indicador o-fenantrolina y se titula con sulfato de amonio ferroso acidificado ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$). El análisis incluye un blanco sin suelo a fin de estandarizar el $K_2Cr_2O_7$. Como sugerencia se tiene que aquellos casos donde más del 75 % de $K_2Cr_2O_7$ es consumido, requieren repetición con una menor cantidad de suelo.

El Cbio descrito en este estudio, que sigue una oxidación húmeda, se basa en el protocolo descrito por Nelson y Sommers (1996), una modificación del método de Walkley y Black, con la particularidad de la aplicación de calor externo durante la digestión de la muestra. En medio fuertemente ácido oxida el C orgánico a CO_2 :



De igual manera, el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ residual es cuantificado por medio de la titulación con sulfato ferroso, usando o-fenantrolina como indicador.

El método que no provee calor externo no asegura la oxidación completa de COS, si no el fácilmente oxidable, y el nivel de recuperación de C varía, yendo del rango de 60 a 86 % (Nelson y Sommers, 1996). Ciertos autores sugieren que debería utilizarse un factor de recuperación específico para cada tipo de suelo y situación (Galantini *et al.* 1994)

Finalmente, los protocolos de digestión húmeda están sujetos a interferencias químicas y también generan productos peligrosos conteniendo cromo, motivo por el cual es una técnica que se tiende a evitar actualmente (Eyherabide *et al.* 2014).

Procedimiento de Oxidación Catalítica por Combustión

La cuantificación del CbioS se inicia con la aplicación del método de FE: fumigación con cloroformo (CHCl_3), seguido de extracción con K_2SO_4 u otro extractante químico (Brookes *et al.* 1985; Vance *et al.* 1987).

El procedimiento se logra por calentamiento a 680 °C en un ambiente con oxígeno dentro de tubos de combustión llenos de un catalizador de platino. El CO_2 generado es enfriado y deshumidificado, luego se detecta usando un analizador de gas, con NDIR. Al adoptar un NDIR de alta sensibilidad, el equipo logra un límite de detección de 4 $\mu\text{g/L}$. Al someter la muestra oxidada al proceso de burbujeo, el CI se convierte en CO_2 , y su concentración se obtiene al detectarla con el NDIR. Seguidamente, la concentración de COT se calcula restando la concentración de CI de la concentración de CT (Figura 5) (Shimadzu 2019).

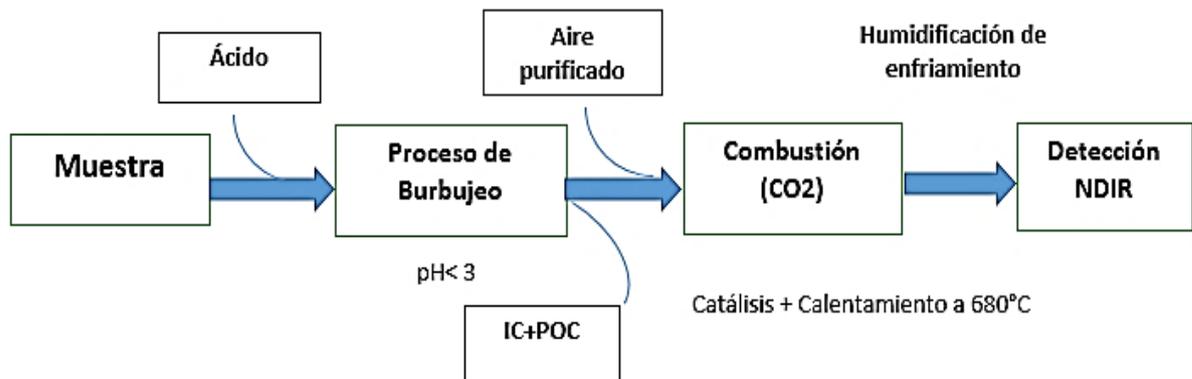


Figura 5: Diagrama de la medición del COT por oxidación catalítica por combustión y detección por NDIR.
FUENTE: Shimadzu (2019).

Los principales criterios detrás de la adopción de un método analítico específico por un laboratorio son la conveniencia, efectividad de costo y el nivel de exactitud (Perie y Ouimet, 2008). El método de FI resulta muy laborioso en su instalación a lo que se le suma los 10 días de incubación, limitando la rapidez de respuesta. Otros inconvenientes con este método, son la restricción para los suelos casi neutros y la falta de validez de las mediciones en presencia de materia orgánica fresca en descomposición (Martens 1995). El método de FE posee varias ventajas sobre el de FI; se puede utilizar, en prácticamente todos los suelos y también en sedimentos de los ríos (Klaus *et al.* 1998), capas de hojarasca (Scholle *et al.* 1992), turba (Brake *et al.* 1999) y muestras de compost (Gattinger *et al.* 2004). Además, un amplio rango de tamaños de muestra puede ser analizado, dependiendo de la homogeneidad del suelo (Joergensen *et al.* 2011).

2.4.3 Carbono oxidable en permanganato (COXP)

El COXP del suelo es una fracción pequeña del COT que responde rápidamente a los cambios en el manejo del suelo. Es importante para la calidad del suelo por su influencia en la estabilidad de agregados y la mineralización del C, N y P. Los parámetros del suelo relacionados al C lábil incluyen el C_{bio}, el N de la biomasa, el C y N mineralizable, la materia orgánica particulada y una fracción ligera de la materia orgánica (Lucas y Weil 2012).

Weil *et al.* (2003) originalmente lo denominaron C activo, el cual ha variado a nombres como: materia orgánica químicamente lábil, C rápidamente oxidable, C lábil y C orgánico

del suelo oxidable en permanganato; Culman *et al.* (2012), propusieron la denominación de carbono oxidable en permanganato (COXP).

El fraccionamiento del COXP, está basado en la susceptibilidad de esta fracción a la oxidación con solución de KMnO_4 (permanganato de potasio) a diferentes concentraciones (33-333 mM). Este método fue introducido originalmente por Loginow en 1987, bajo la premisa de la descomposición microbiana de la MOS y que a la vez está relacionado a los procesos de oxidación enzimática en los microorganismos (Weil *et al.* 2003). Blair *et al.* (1995) modificaron el proceso usando una concentración simple de KMnO_4 (333 mM) como agente oxidante. Además, el C que es oxidado por el KMnO_4 antes de una hora es considerado como lábil y el remanente como no lábil (Tirol *et al.* 2004). Las transformaciones del COXP, dependen de la actividad microbiana del suelo, por lo que las tasas de cambio cuantitativo de la fracción lábil están muy relacionadas al pH, aireación del suelo, humedad, temperatura y disponibilidad de compuestos de C y N (Kolár *et al.* 2011). Así también, las fuentes de COXP pueden ser medidas en diferentes profundidades del perfil, lo que indica que es móvil. Esto puede indicar que es requerido para los procesos de desnitrificación y metanogénesis (Blair *et al.* 1995).

El método de cuantificación para la presente investigación es tomado de las referencias de Blair *et al.* (1995) y Weil *et al.* (2003). El fundamento consiste en oxidar la fracción lábil del COS con una solución de ataque de KMnO_4 .

2.5 CAMBIOS DE USO ACTUAL DE TIERRA (UAT)

Se tiene como referencia que cuatro componentes del manejo agrícola tienen la capacidad de alterar las propiedades del suelo: cambios en la biomasa vegetal, labranza, fertilización e irrigación. El cambio de uso de suelo originado por las actividades agrícolas sustituye a la vegetación natural de los ecosistemas, modificando las características del suelo (Raiesi 2012), la labranza altera las propiedades físicas, la fertilización incrementa el suministro de nutrientes y el riego podría originar procesos de salinización y sedimentación (McLauchlan 2006).

Dados los cambios en la MOS se modificarían algunas características del suelo, por ejemplo, la densidad, estabilidad de los agregados, porosidad, actividades enzimáticas y BMS, con lo que se alteraría la dinámica de los ciclos de nutrientes (Beheshti *et al.* 2012; Raiesi 2012).

En los últimos 150 a 300 años, entre 25 y 50 Pg de C han sido liberados a la atmósfera, principalmente debido a la labranza (Houghton, 2012; Powlson *et al.* 2012; West y Post 2002). La labranza convencional con rompimiento del suelo produce una aceleración en los procesos de descomposición del C orgánico, por oxidación prematura de la MOS (Crovetto 1996; Alvear 2006).

En cambio, en una agricultura de labranza mínima o cero, se parte de la premisa que cuanto menos disturbado sea el suelo, mayor cantidad de materia orgánica puede ser retenida en forma de C almacenado, lo cual no contribuiría al calentamiento global por las emisiones de CO₂. Sin embargo, no hay evidencia científica patente que confirme que este tipo de agricultura estimule el secuestro de C en los suelos agrícolas de forma global. Al parecer, los beneficios de aumento de C en el suelo bajo labranza cero están en función de los ingresos de materia orgánica en forma de *mulch* (Giller *et al.* 2011; Gattinger *et al.* 2011). Ante esto, el ingreso de material vegetal resultaría determinante para el incremento de la cantidad de C en el suelo y por ende del C_{bio}, tal como describen Rolando *et al.* (2017), en las tierras de cultivo de Puna, el estiércol y los residuos de plantas son los mayores aportes de nutrientes al suelo, mientras que las salidas son las cosechas y la erosión.

La extensión de área de cultivo de maca ha disminuido en los últimos años, comparando las campañas 2017-2018 y 2018-2019 (agosto-mayo), se tienen 1292 y 982 Has sembradas, respectivamente. Sin embargo, en la campaña 2014-2015 (agosto-diciembre) se tuvieron 6091 Has. Esto es atribuible diversos factores económicos; sin embargo, es de resaltar que ante la demanda de años atrás se estuvieron utilizando cada vez más áreas de pastos nativos. Además, se incrementaron áreas de descanso, teniendo dos o tres estaciones de crecimiento anuales por ocho de descanso; incluso ante la intensificación del cultivo esta práctica se ha acortado en tiempo o eliminado, lo cual se ha compensado con el uso de fertilización química y estiércol, alterando el ciclo de nutrientes en la Puna (Rolando *et al.* 2017; McDowell y Hess 2012; Perez *et al.* 2010; Rocha 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

Los ensayos se realizaron en la Unidad de Investigación y la Unidad de Microbiología de Suelos del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (LASPAF), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

3.2 ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

3.2.1 En el efecto del pretratamiento de la muestra y la refrigeración de extractos

a) **Primer ensayo:** Distrito de Paucas, provincia de Huari, departamento de Ancash.

b) **Segundo ensayo:** Distrito de Pullo, provincia de Parinacochas, departamento de Ayacucho, en la sierra central; distrito de San Ramón, provincia de Chanchamayo, departamento de Junín, en ceja de selva (Cuadro 2, Anexo 5).

Cuadro 2: Características de los suelos evaluados.

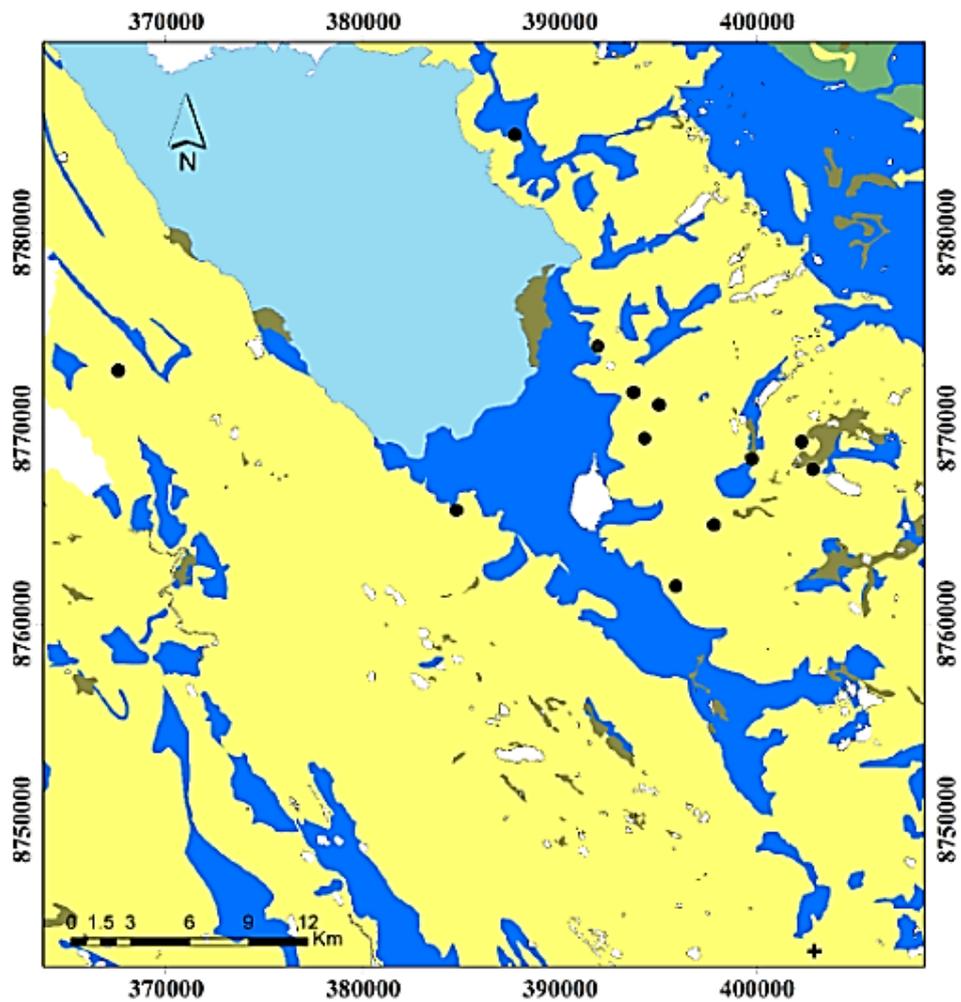
Muestra	Procedencia	Profundidad de muestreo (cm)
M1		0-25
M2		26-37
M3		38
M4		0-35
M5	Dpto: Ayacucho	36-46
M6	Provincia: Parinacochas	0-35
M7	Distrito: Pullo	36-52
M8		0-33
M9		34-56
M10		0-33
M11		34-60
M12	Dpto: Junín	0-20
M13	Provincia: Chanchamayo	0-20
M14	Distrito: San Ramón	0-20

3.2.2 En la comparación de métodos para la determinación del Cbio y determinación de su relación con otros parámetros

Las muestras fueron tomadas en las provincias de Junín y Yauri en el Departamento de Junín, correspondientes a los Andes Centrales del Perú y sobre los 4000 m.s.n.m. Donde se encuentran diferentes UAT: suelos con cultivo de maca (n=18), en barbecho (n=11), pasto nativo (n=36) y pastura (n=14). Los pastos incluían géneros como *Poa*, *Stipa*, *Calamagrostis* y *Festuca*; en cambio las pasturas incluían *ryegrass* (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*).

De acuerdo a la clasificación de Andes Tropicales (Josse *et al.* 2009), el área de estudio está localizado dentro de Pastizal Altoandino de la Puna Húmeda. La precipitación en la región es altamente estacional, más del 50 % de la precipitación anual ocurre durante el verano austral (diciembre-marzo) (Vuille y Keimig, 2004), la cual es alrededor de 1000 mm, siendo más intensa cerca al lago de Junín. El promedio máximo y mínimo anual de temperatura diaria es de 10 a 14 °C y -2 a 2 °C, respectivamente (Gobierno Regional de Junín 2015). Según la clasificación *Soil Taxonomy* de la USDA, los suelos en el área de estudio son predominantemente *Inceptisols* del suborden *Ustepts*, y *Entisols* de los subórdenes *Orthents* y *Fluvents* (Soil Survey Staff 2014) (Figura 6).

Los lugares específicos de muestreo fueron determinados por el investigador líder del estudio, el cual se realizó en forma no aleatoria y según el permiso de los propietarios de los campos. Doce campos diferentes en los alrededores del lago de Junín se incluyeron en el estudio. Las características del suelo fueron analizadas a nivel de parcela, las cuales fueron definidas con un área aproximada de 1000 m² dentro de una pendiente homogénea y un mismo UAT. El uso de maca abarcó cultivos de uno a tres años desde su introducción y contrastantes pendientes, mientras que los suelos en barbecho tenían más de siete años en esta condición; por su parte, las pasturas de *ryegrass*-trébol blanco (*Trifolium repens*) tenían un establecimiento de más de 40 años (Anexo 5). Las muestras compuestas provinieron de 20 submuestras tomadas de puntos en transecto de zigzag. Siendo una mezcla colectada de 8 kg del perfil de suelo arable (0-30 cm de profundidad).



Leyenda

- Chacras de cultivo de maca
- ✚ Chacras de pastura
- Lago Junín
- Entisoles
- Histosoles
- Inceptisoles
- Mollisoles



Figura 6: Mapa de suelos del área de estudio.
FUENTE: Rolando (2016).

3.3 MATERIALES Y EQUIPOS

Instrumental de vidrio de borosilicato resistente a altas temperaturas

Desecador con llave de paso

Papel filtro Whatman N°42

Agitador Horizontal Marca: JEIO TECH Modelo: SK-300

Bomba de vacío

Analizador de carbono Marca: Shimadzu Modelo: TOC-L CSH

Incubadora Marca: Memmert Modelo: IF75plus

Estufa Marca: Binder

Congeladora Marca: Electrolux Modelo: E32AF75FPS6

Refrigeradora Marca: Electrolux Modelo: E32AR75FPS5

3.4 METODOLOGÍAS

3.4.1 Determinación del Cbio

El manejo y almacenamiento de muestras, varió según método de determinación: para el CbioI no fue molida ni secada antes de su procesamiento y sólo fue refrigerada por tiempo mínimo; en cambio, para el CbioS y CbioWB la muestra tuvo molienda moderada, fue secada a estufa y refrigerada un tiempo medio.

a. Fumigación - Incubación (FI)

La técnica de FI se basa en el análisis del CO₂ liberado en muestras de suelo previamente fumigadas con cloroformo, y posteriormente inoculadas con suelo fresco y comparado a su vez con otras muestras de suelo sin fumar, obteniéndose el CbioI.

Las muestras a ser fumigadas fueron secadas a 40 °C, tamizadas con una malla de 2 mm de diámetro y expuestas a los vapores de cloroformo puro, efectuando previamente vacío en el desecador. El sistema se mantuvo por 24 horas en oscuridad para evitar su descomposición.

Seguidamente, las muestras (tanto fumigadas como no fumigadas) se incubaron en frascos de 400 ml de capacidad, llevándose a capacidad de campo cada una de las muestras y una parte de ellas (fumigadas) se inoculó con el equivalente al 2 % del peso total. El sistema estuvo herméticamente cerrado para la cuantificación del CO₂ producido a través de la absorción con álcali (NaOH 1 N) durante 10 días. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a titular con ácido (HCl 0.5 N) (Jenkinson y Powlson 1976).

La BMS se expresó finalmente como:

$$\text{BMS} = \text{mg de CO}_2 / \text{g de suelo seco} = X - Y / k$$

Donde:

X = mg de CO₂ / g de suelo fumigado, reinoculado e incubado durante 10 días.

Y = mg de CO₂ / g de suelo no fumigado e incubado durante 10 días.

k = constante, el valor 0.45 representa la fracción de la biomasa total del suelo que puede ser mineralizada en estas condiciones (Wu *et al.* 1990).

b. Fumigación - Extracción (FE)

El C orgánico extraído en una solución de K₂SO₄ (0.5 M) es determinado en muestras de suelo fumigadas y no fumigadas (controles), el incremento en las cantidades de C de las muestras fumigadas respecto a los controles, es considerado como C_{bio}.

El suelo seco se expuso a los vapores de cloroformo puro, tal como se mencionó en la sección anterior. Para realizar la extracción del C, los 10 g de suelo se pasaron a un tubo de centrífuga de 50 ml de capacidad y se añadieron 40 ml de una solución de K₂SO₄ 0.5 M, siendo sometidos a agitación horizontal de 110 rpm por una hora. Luego, se obtuvo el extracto de suelo empleando papel filtro Whatman N°42. Los controles no fueron sometidos a fumigación (Brookes *et al.* 1985).

A partir de la obtención de este extracto derivan dos metodologías para la cuantificación del C_{bio}:

- **Procedimiento de oxidación húmeda**

El método seguido es el descrito por Nelson y Sommers (1996), similar al procedimiento de Walkley-Black pero con la aplicación de calor externo para la reacción de la mezcla, por lo cual se denominó C_{bio}WB.

Para la determinación se transfirieron 4 ml del extracto de cada muestra en un vaso de precipitado y se adicionó 1 ml de $K_2Cr_2O_7$ 0.0667 M y 5 ml de H_2SO_4 concentrado, mezclando todo el tiempo. Así también, se prepararon blancos (con agentes pero sin extractos). Se situaron los vasos de precipitado en un bloque precalentado, a 150 °C por 30 minutos, dejándose blancos sin calentar. Se transfirieron cuantitativamente los contenidos de los vasos de precipitado a matraces, y se adicionaron 0.3 ml (3-4 gotas) de solución indicadora de o-fenantrolina. Se tituló con solución de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (0.033 M), y anotó el gasto para cada muestra (ml muestra), el blanco calentado (ml HB) y el blanco no calentado (ml UB). El Cbio del suelo se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Carbono orgánico (\%)} = ((A \times M \times 0.003)/g) \times (E/S) \times 100$$

Donde:

M = Molaridad del $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ (0.033 M)

A = (ml HB- ml muestra) x ((ml UB-ml HB)/ml UB) + (ml HB-ml muestra)

g = masa del suelo seco (g)

E = Volumen de extracción (ml)

S = Volumen de digestión de muestra (ml).

El Cbio del suelo se calculó con la diferencia entre el C determinado en las muestras fumigadas con respecto al C determinado en las muestras no fumigadas.

- **Procedimiento de oxidación catalítica por combustión**

El C en el extracto de suelo fue determinado por combustión a 680 °C, utilizando el analizador de C TOC-L Shimadzu.

El Cbio del suelo se calculó de la siguiente manera:

$$C_{bio} = E_c / K_{ec}$$

Donde:

E_c es la diferencia entre el C determinado en las muestras fumigadas con respecto al C determinado en las muestras no fumigadas.

K_{ec} considerado fue 0.4 (Högberg y Högberg 2002).

3.4.2 Determinación del Carbono Oxidable en Permanganato (COXP)

Se utilizaron los reactivos:

- Solución stock de KMnO_4 0.2 N: Es la solución madre, formulada en mayor concentración.
- Solución de oxidación o ataque (KMnO_4 0.02 N): 100 ml de la solución stock anterior fueron llevados a una fiola de 1000 ml y disueltos en solución de CaCl_2 0.0025 M. El pH fue ajustado a 7.2 con NaOH 0.1 M y el volumen enrasado a 1000 ml.

Para la cuantificación se pesaron 5 g de muestra de suelo homogenizado y tamizado con malla de 2 mm. Se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 mL, añadió 20 mL de la solución de oxidación y llevó a agitación horizontal por 2 minutos y se dejó sedimentar 10 minutos. Luego, se transfirieron 0.5 mL del sobrenadante en un tubo de centrifuga conteniendo 45 mL de agua destilada y se enrazó a 50 mL. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro a 550 nm.

Para la curva de calibración se prepararon concentraciones conocidas a partir de la solución de ataque y leyeron en espectrofotómetro a 550 nm.

La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$\text{COXP} = [0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} - (a + b \times \text{Abs})] \times (9000 \text{ mg C} \cdot \text{mol}^{-1}) \times \left(\frac{0.02 \text{ L solución}}{0.005 \text{ kg suelo}} \right)$$

Donde:

0.02 mol/L: es la concentración de la solución inicial de KMnO_4

a y b: intercepto y la pendiente de la curva estándar

Abs: Absorbancia obtenida por el espectrofotómetro

9000 mg: Peso de C (0.75 mol) oxidado por 1 mol de MnO_4^- cambiando de Mn^{7+} a Mn^{2+} ;

0.02 L: Volumen de la solución de KMnO_4 que reaccionó

0.005 kg: Peso del suelo usado.

3.4.3 Determinación de Carbono Total (CT), Nitrógeno Total (NT) y Carbono

Orgánico Total del suelo (COT)

El CT y NT del suelo fueron medidos insertando 30 mg de muestra molida con esferas y secada en horno a 60 °C, en un analizador elemental de combustión seca (Vario Micro cube, Elementar, Hanau, Germany).

Por otro lado, para medir el COT, los carbonatos fueron removidos del suelo por fumigación ácida con HCl, siguiendo una modificación de Ramnarine *et al.* (2011). Seguidamente, los suelos fueron secados a estufa a 60 °C por 48 horas y la concentración de C fue medida en el mismo analizador utilizado para el CT y NT.

3.4.4 Determinación del Stock de Carbono Orgánico del Suelo (COS stock)

El COS Stock fue determinado en el perfil de capa arable (0-30 cm). La densidad aparente de la matriz del suelo fue medida utilizando un cilindro metálico de 5 cm de diámetro, a una profundidad del suelo de 15 a 20 cm, después de la corrección de los fragmentos gruesos sugerida por Hao *et al.* (2008).

3.4.5 Evaluación del efecto del pre-tratamiento: Ajuste de humedad e incubación, y refrigeración de extractos

Se realizaron ajustes de humedad al 50 y 60 %, las mismas que se incubaron a 25 °C durante ocho días (Guerrero *et al.* 2003). Además, se testeó el efecto que tiene la refrigeración de los extractos a 10 °C a corto plazo (24 horas previas al análisis) (Cuadro 3).

Posteriormente se evaluó el efecto que tiene la refrigeración de los extractos a 10 °C a largo plazo (11 días), para ello se tuvieron 14 muestras de suelo y se aplicaron los siguientes tratamientos:

Tratamientos:

- Análisis de extractos sin refrigerar.
- Análisis de extractos refrigerados a 10 °C durante 11 días.

Cuadro 3: Tratamientos evaluados en el experimento.

Tratamiento	Refrigeración	Humedad	Incubación (8 días)
SNPT	Sin	Seco al aire (Testigo)	No
SIH50	Sin	50 %	Sí
SIH60	Sin	60 %	Sí
CNPT	Con	Seco al aire (Testigo)	No
CIH50	Con	50 %	Sí
CIH60	Con	60 %	Sí

3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS

En la evaluación del efecto del pre-tratamiento con el ajuste de humedad e incubación, y refrigeración de extractos por 24 horas, el diseño estadístico fue un DCA con arreglo factorial 3 x 2. Aplicación del test de normalidad Shapiro Wilk y análisis de variancia (ANVA). Los promedios de cada combinación refrigeración y humedad fueron comparados empleando la prueba de comparación de medias HSD Tukey ($\alpha = 0.05$).

En el caso de la refrigeración de extractos por 11 días, el diseño estadístico fue un DCA. Aplicación del test de normalidad Shapiro Wilk y análisis de variancia (ANVA), con pruebas de comparación de medias HSD Tukey.

En el análisis del Cbio cuantificado por diferentes metodologías y las respectivas correlaciones con otros parámetros del suelo, los resultados fueron evaluados estadísticamente, a través de un Análisis de Componentes Principales (ACP), realizándose un Biplot y un Mapa de factores individuales. Así también, se hicieron correlaciones lineales entre métodos y otros parámetros del suelo. Se emplearon los paquetes *Library* (xlxs), *Library* (agricolae), *Library* (FactomineR) del ambiente para cómputo estadístico R, versión 3.3.2 (R Core Team 2016).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DEL PRE-TRATAMIENTO: AJUSTE DE HUMEDAD E INCUBACIÓN, Y REFRIGERACIÓN DE EXTRACTOS

En la cuantificación del C se tuvieron diferencias significativas parciales en cuanto al efecto del ajuste de humedad e incubación, tanto para las muestras fumigadas como para las no fumigadas; sin embargo, con el procesamiento de datos no se afectó el resultado final de Cbio, calculado por la diferencia de éstas y la aplicación del factor de corrección. Por tal, el pretratamiento de ajuste de humedad e incubación no mostró mayor impacto en el análisis de la muestra

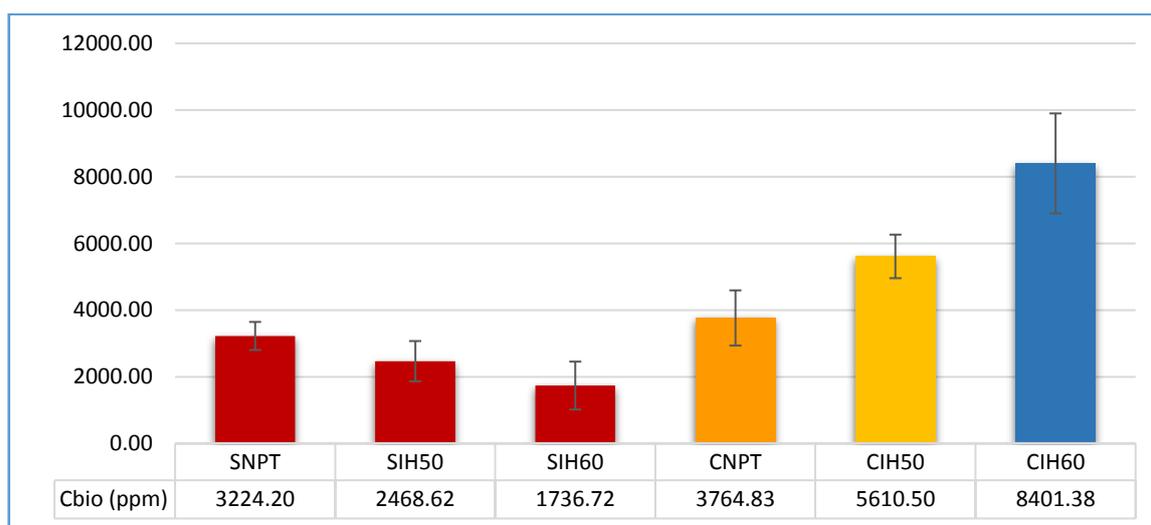


Figura 7: Efecto del Pre-tratamiento y refrigeración de extractos a corto plazo en el Cbio obtenido.

En cambio, la refrigeración de extractos afectó el resultado final de Cbio. Se observó que realizada por 24 horas incrementó la cantidad analizada de Cbio de forma considerable, y se presume que esto fue debido al colapso celular de aquellos microorganismos que no sufrieron la lisis por el cloroformo durante la fumigación y/o a la mayor disponibilidad de materia orgánica con el cambio de temperatura durante la realización del análisis (Figura 7, Anexo 1).

En cuanto a la evaluación del efecto de la refrigeración de extractos a largo plazo. Se encontraron diferencias entre muestras, y se volvió a notar un efecto marcado de la refrigeración en la determinación del Cbio. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la profundidad a la cual se tomó la muestra de suelo (Cuadro 4).

Cuadro 4: Cuantificación del Cbio en las diferentes muestras y efecto de la refrigeración a largo plazo del extracto.

Muestra	Procedencia	Profundidad (cm)	Cbio (mg.kg ⁻¹)	
			No Refrigeración	Refrigeración
M1	Manzanayoc	0-25	2030.72	1446.97
M2	Manzanayoc	26-37	940.64	661.26
M3	Manzanayoc	38	463.54	658.56
M4	Pararani	0-35	1980.66	2212.35
M5	Pararani	36-46	1353.71	987.02
M6	Influencia Tampa	0-35	3307.50	2376.01
M7	Influencia Tampa	36-52	1014.63	319.97
M8	Chinqueni	0-33	2065.02	1875.39
M9	Chinqueni	34-56	2032.44	1422.14
M10	Antallana Pullo	0-33	1924.64	1451.54
M11	Antallana Pullo	34-60	868.93	NC*
M12	Chanchamayo-teca	0-20	2398.80	1020.18
M13	Chanchamayo-café	0-20	1543.09	520.87
M14	Chanchamayo-ojé	0-20	2176.34	810.95

*NC: No cuantificable

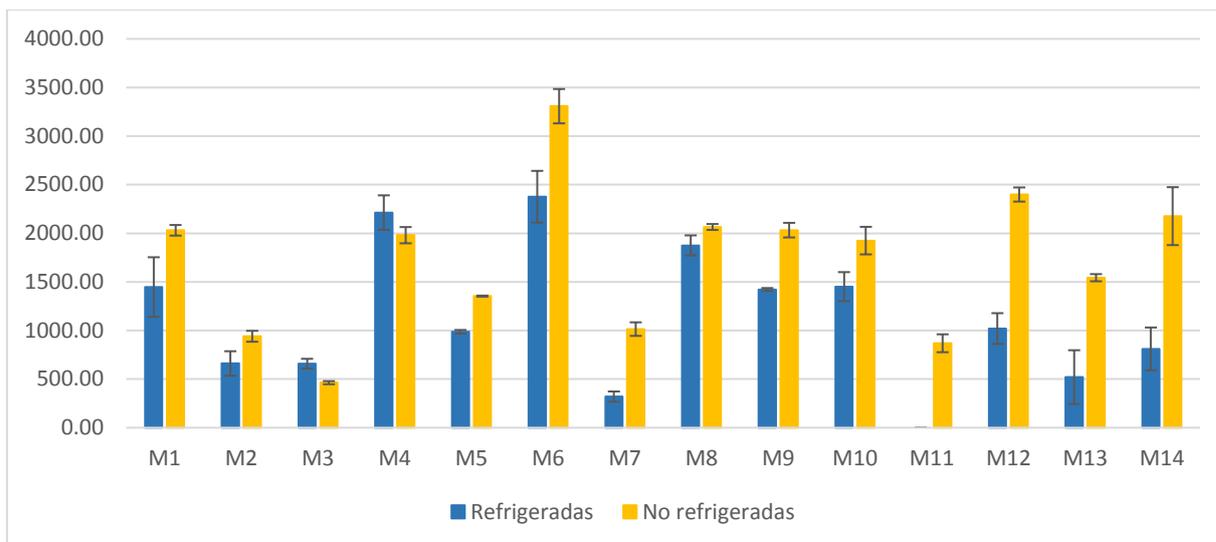


Figura 8: Efecto de la refrigeración prolongada sobre la cuantificación del Cbio.

En este caso, la refrigeración del extracto por 11 días se tradujo en una disminución del Cbio, lo cual puede ser atribuido a la precipitación de las sales al ser sometidas a bajas temperaturas, que trajo consigo la formación de un agregado que posiblemente atrapó el C, impidiendo ser cuantificable, lo cual concuerda con la baja solubilidad del K_2SO_4 a baja temperatura (Silberberg 2012) y los problemas analíticos observados por Joergensen (1996) (Anexo 4). Este efecto también puede ser atribuido a la proliferación de psicrótrofos en la muestra refrigerada, los cuales al cabo de varios días agotaron el C liberado utilizándolo como nutriente.

Se observa una disminución sustancial con la profundidad, siendo el Cbio mayor en los primeros centímetros, donde se encuentra la capa arable (Figura 8, Cuadro 4).

Por otro lado, si bien los porcentajes de COT presentan valores medios a bajos, el Cbio constituye una fracción representativa de éste (Cuadro 5).

Al analizar la correlación entre CbioR y CbioNR se obtuvo un r : 0.76 y p-valor: 0.0015, lo cual la hace significativa. Sin embargo, la refrigeración no es indiferente en su utilización como pre-tratamiento, dado que se observó correlación del CbioNR con el COXP y COT con un r : 0.74, 0.58, y p-valor: 0.0025, 0.0299, respectivamente; caso contrario, con el CbioR, un r : 0.53, 0.40, y p-valor: 0.0507, 0.1517, lo cual lo hace no significativo. Con esto, se muestra que habrá mejor correlación si se evita la refrigeración (Anexo 2).

Cuadro 5: Cbio, COXP y COT obtenido de suelos de Ayacucho y Junín.

Código de muestra	CbioR (mg.kg⁻¹)	CbioNR (mg.kg⁻¹)	COT (%)	COXP (mg.kg⁻¹)
1	1446.97	2030.72	1.29	693.24
2	661.26	940.64	0.30	326.58
3	658.56	463.54	0.14	169.01
4	2212.35	1980.66	1.21	608.88
5	987.02	1353.71	0.90	391.17
6	2376.01	3307.50	0.66	533.71
7	319.97	1014.63	0.11	146.46
8	1875.39	2065.02	1.15	627.25
9	1422.14	2032.44	0.55	502.53
10	1451.54	1924.64	0.59	482.21
11	NC*	868.93	0.32	244.45
12	1020.18	2398.80	1.26	697.13
13	520.87	1543.09	1.26	698.25
14	810.95	2176.34	1.26	632.27

*NC: No cuantificable

4.2 COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CBIO

4.2.1 Relación del Cbio con otros parámetros del suelo

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) a fin de establecer las relaciones entre el Cbio, determinado por las diferentes metodologías descritas, y otros parámetros, tales como, la textura (porcentajes de arena, limo y arcilla), cantidad de fósforo, pH, NT, CT, COT, COS Stock, CIC, las tasas C:N y COT:N.

CORRELACIONES DE LAS VARIABLES

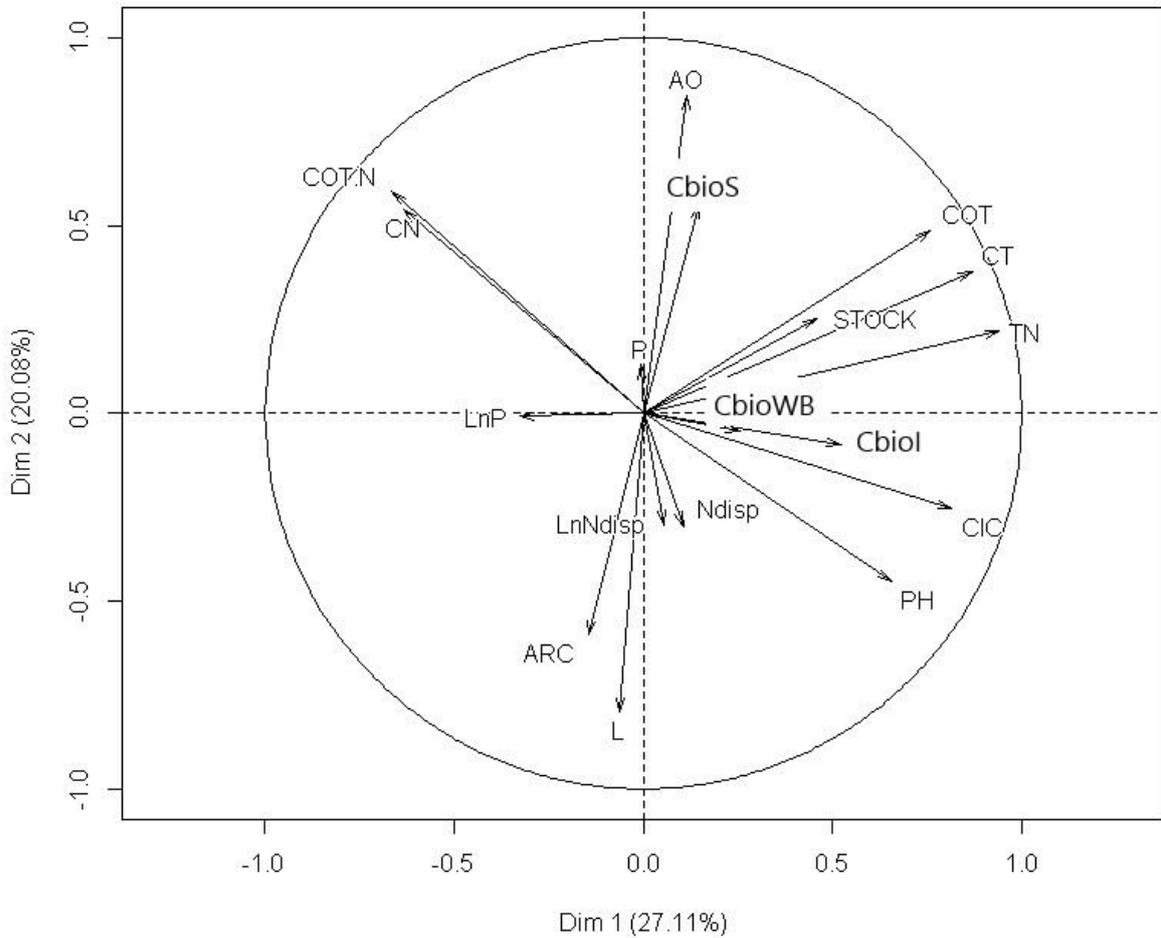


Figura 9: Análisis de la correlación del Cbio y otros parámetros del suelo.

La Figura 9 permite visualizar la magnitud y signo de la contribución de cada variable a estos dos componentes. Como resultado de este análisis, los componentes principales explicaron alrededor del 47 % de la variación. El primer componente principal explica alrededor del 27 % y está relacionado con variables como el CT, COT, NT, CIC, pH, entre otros; mientras que el segundo componente explica alrededor del 20% y se relaciona con el porcentaje de arena (AO), limo (L) y arcilla (AR), que determinan la textura del suelo. La proyección de los vectores, muestra cuánto peso tienen en el componente principal; así mismo, cuánto más alejados estén los vectores del origen de un componente principal más influencia poseen.

La correlación entre CbioS y el contenido de arcilla es negativa, contrariamente a lo que podría ser previsto; sin embargo, dicho comportamiento ha sido observado por otros autores, siendo explicado por la efectividad de otros factores como el clima, vegetación y topografía (Insam *et al.* 1989). Además, la textura de los suelos fue franco arenosa en su mayoría.

4.2.2 Distribución de los suelos analizados según uso de la tierra

En el mapa de factores individuales se observa una distribución de los suelos por el uso de tierra. De esto, se deduce una mayor relación de los suelos pertenecientes a pasturas con el primer componente, y de los suelos de maca y descanso en el segundo. Sin embargo, en general los suelos de los UAT fueron heterogéneos, no se agruparon definidamente y hubo traslape por valores similares en los parámetros evaluados (Figura 10).

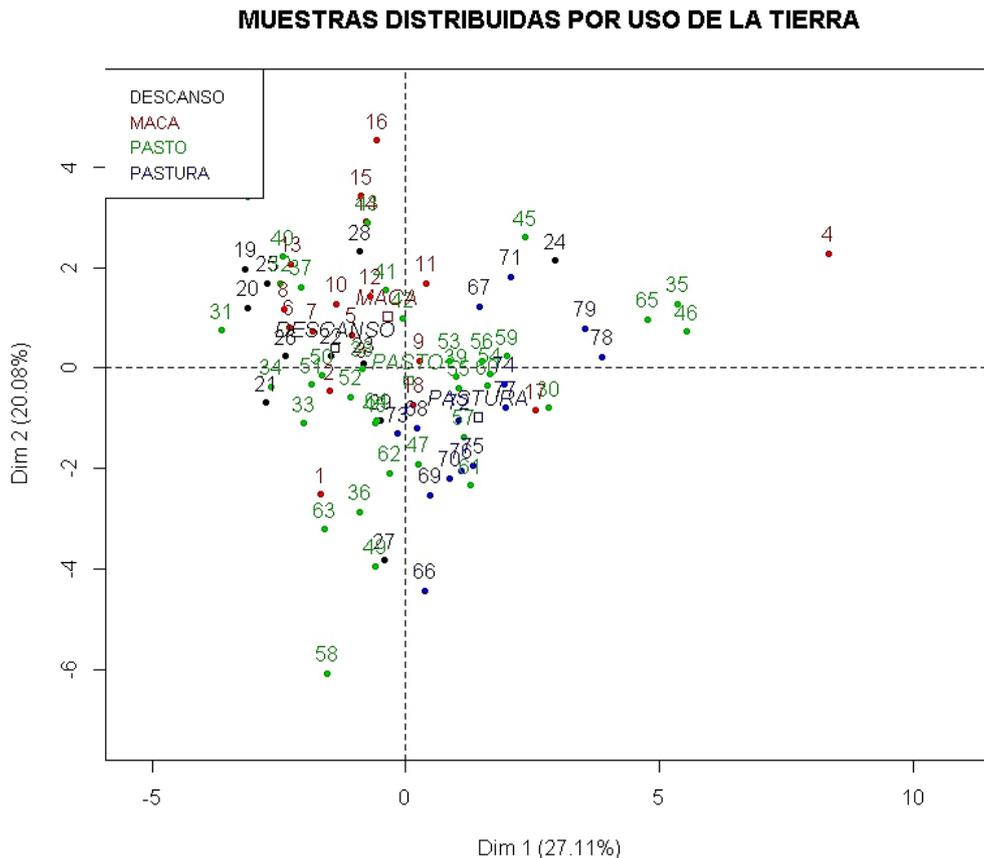


Figura 10: Distribución de las muestras en base a sus características y según el uso de la tierra.

El manejo agrícola y sus consecuencias en la diversidad de las comunidades microbianas no están del todo esclarecidas. Algunos trabajos han identificado una disminución en la

diversidad (Lupwayi *et al.* 1998), mientras que otras investigaciones manifiestan un incremento (Jangid *et al.* 2008), por lo que la respuesta dependería de las condiciones del ecosistema.

Hartmann y Windmer (2006) encontraron que la diversidad de las comunidades bacterianas no se modificaba en sitios con manejo contrastante (convencional, biodinámico y orgánico); sin embargo, identificaron cambios en la estructura de las mismas. Adicionalmente, el tipo de fertilización también tiene un efecto en la composición de las comunidades; Chaudhry *et al.* (2012) analizaron las comunidades bacterianas en sitios fertilizados química y orgánicamente, encontrando una mayor diversidad en estos últimos.

4.2.3 Comparación del Cbio cuantificado según las diferentes metodologías

El Cbio fue determinado a partir de suelos fumigados, siguiendo metodologías de vanguardia como la que utiliza extracción y oxidación catalítica por combustión con analizadores automatizados, como el TOC-L Shimadzu (CbioS), y otras más tradicionales como la incubación y titulación (CbioI), y la extracción y oxidación húmeda (CbioWB).

Los resultados del análisis de Cbio, separados por metodología a través de diagramas de cajas, muestran la amplia dispersión de los datos. Esto posiblemente al uso previo de los terrenos y la variabilidad de los mismos por la pendiente, porcentaje de cobertura y fertilización aplicada.

En la determinación de CbioS, comparando las medianas, se obtuvo una mayor cantidad en el uso de maca (1545.87 mg.kg⁻¹), seguido de pasto nativo (1111.05 mg.kg⁻¹), pastura (327.31 mg.kg⁻¹) y suelo en barbecho (91.84 mg.kg⁻¹) (Figura 11).

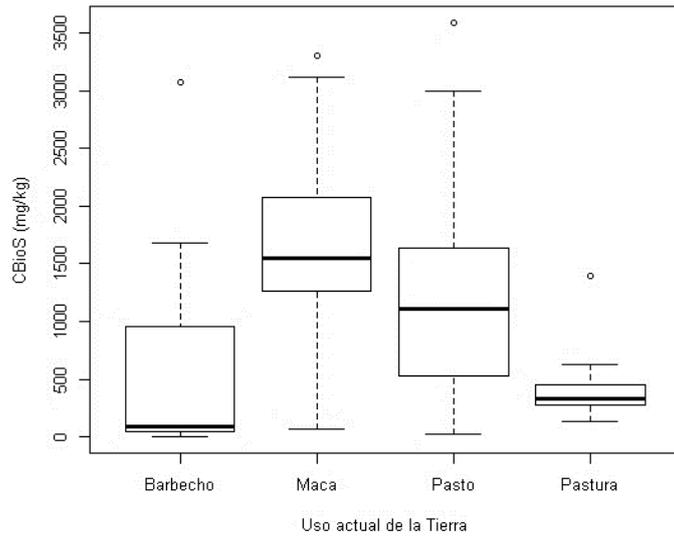


Figura 11: Cbio con utilización del analizador de C (CbioS) en diferentes UAT.

El CbioI, mostró valores menores a los reportados como CbioS, en la comparación de medianas no se obtuvieron diferencias resaltantes según el UAT, los valores fueron en el de cultivo de maca $208.39 \text{ mg.kg}^{-1}$, pasto nativo $251.38 \text{ mg.kg}^{-1}$, pastura $280.87 \text{ mg.kg}^{-1}$ y en barbecho $233.73 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Figura 12).

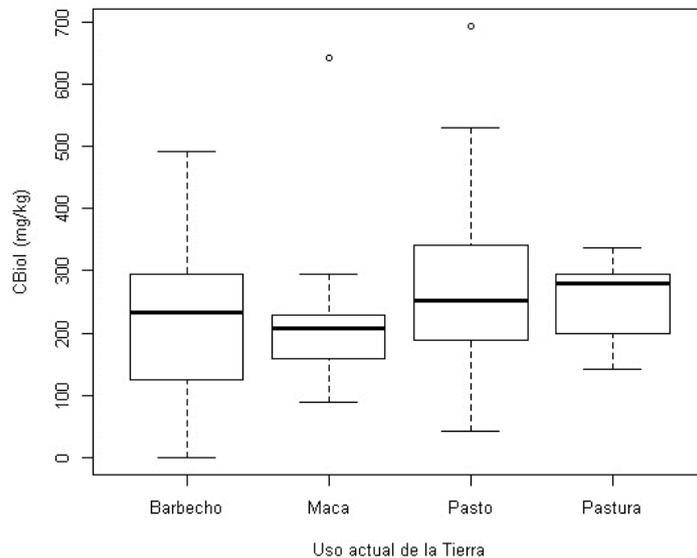


Figura 12: Cbio determinado por FI (CbioI) en diferentes UAT.

El CbioWB mostró valores altamente variables y poco confiables, en el uso de maca 62.32 mg.kg^{-1} , pasto nativo 4.68 mg.kg^{-1} , pastura 76.32 mg.kg^{-1} y en barbecho 5.95 mg.kg^{-1} (Figura 13).

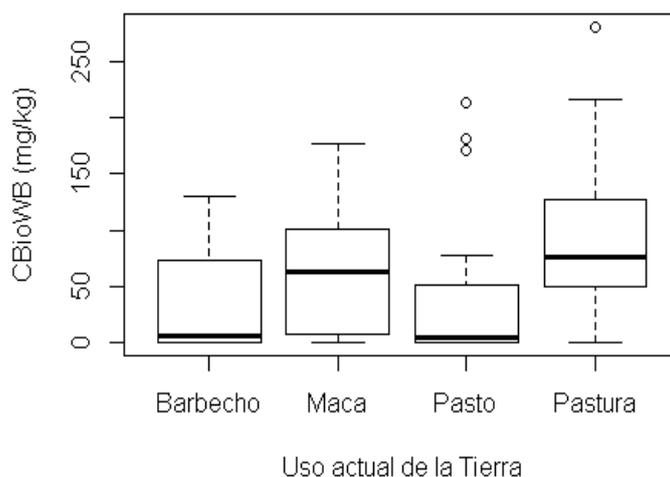


Figura 13: Cbio determinado por FE y oxidación húmeda (CbioWB) en diferentes UAT.

Por otro lado, no se llegaron a determinar correlaciones significativas entre los métodos evaluados (Anexo 3).

La metodología que hace uso del analizador de C permite cuantificaciones directas y por ende más exactas. En los resultados destacan los altos valores para la cuantificación de los suelos con cultivo de maca y pasto nativo; al respecto, Anderson y Domsch (1989) refieren cantidades de 100 a 600 ppm en cereales y 1500 ppm en praderas y suelo virgen, este último valor es comparable con los resultados hallados en similares condiciones

Cabe resaltar que la mediana de pH para los campos de maca fue 4.75, pasto 5.48, pastura 6.72 y en suelo en descanso 4.53. Es un fenómeno bien establecido que el procedimiento FI da resultados no confiables en suelos ácidos (Jenkinson 1988), por ello, los resultados obtenidos en pasturas serían los más fidedignos con esta metodología y condiciones. En contraste, el método FE puede ser usado sobre un amplio rango de pH del suelo (Vance *et al.* 1987).

El método de FI (Jenkinson y Powlson 1976), fue ideado para suelos agrícolas bien drenados y con un relativo bajo contenido de materia orgánica, lo cual no resultaría ideal para los suelos estudiados; sin embargo, es el de uso frecuente en los análisis de laboratorio cotidianos. Su extensa utilización es por poseer ventajas como tener el kC documentado y que a partir del método se encuentren diversas formas de determinar el C y N. A pesar de ello, se tienen los supuestos de que la incubación afecta a la biomasa microbiana y no a la

materia orgánica, también que el número de microorganismos muertos en el suelo no fumigado es despreciable comparado con el fumigado. Así también, se asume que la velocidad de respiración de los suelos fumigados y no fumigados es igual.

Por otro lado, el método modificado de Walkley - Black (CbioWB) sería confiable siempre que se utilicen factores de corrección específicos del área de estudio, porque la capacidad de adsorción de energía calorífica por los diferentes suelos varía, dependiendo de la materia orgánica y el contenido de arcilla (Kaiser *et al.* 1992). Además, como se mencionó anteriormente los iones Fe^{2+} y Cl^- del suelo, pueden interferir con la reacción de oxidación del $K_2Cr_2O_7$ de forma positiva, mientras que el MnO_2 lo haría negativamente (Nelson y Sommers, 1996).

En cuanto a las comparaciones entre metodologías, se tiene el antecedente de Wardle y Parkinson (1991), que analizaron las relaciones entre los métodos RIS, FI y FE, concluyendo relaciones estadísticas no fidedignas y que todas las calibraciones tenían un error asociado. Desde otro punto de vista, si bien la teoría propone que el cambio de uso a suelo agrícola disminuye el COT del suelo, mientras que la suspensión de las prácticas agrícolas provocaría un aumento del mismo. Los resultados hallados para la determinación de Cbio muestran una tendencia opuesta, el suelo con cultivo de maca presenta un 39 % más respecto al pasto, más de cuatro veces lo encontrado en pastura y más de 16 lo hallado en suelo en barbecho.

El cultivo de maca presenta un manejo de labranza mínima o cero, este tipo de manejo ha probado en numerosos trabajos ser una práctica ecológicamente amigable; estudios como los de Vidal *et al.* (1997), refieren un incremento de 30 a 40 % en Cbio comparado con la labranza convencional.

Por consiguiente, el uso de suelo con un cultivo no tendría mayor impacto en el Cbio, siempre que la labranza sea mínima. Los suelos en barbecho, tuvieron un menor valor en Cbio, CT, COT, C Stock y NT en la comparación de medianas, lo cual revela la importancia del manejo agronómico constante en la fertilidad del suelo, a fin de evitar procesos erosivos. El Cbio se incrementaría con aquellas prácticas que incrementen las entradas de C orgánico y mejoren las condiciones para la supervivencia de los microorganismos, por ello, el mayor Cbio en el uso de maca mostraría la importancia de este cultivo para el desarrollo de la microbiota andina.

4.2.4 Relaciones del Cbio con otros parámetros del suelo

En el análisis global, el Cbio, en sus formas de detección CbioS, CbioWB y CbioI, están relacionadas con el COT, CT, COS Stock y NT de la siguiente manera:

Se obtuvieron, correlaciones significativas del CbioS con el CT ($r: 0.36$, p -valor: 0.0011), COT ($r: 0.38$, p -valor: 0.0005), NT ($r: 0.24$, p -valor: 0.0329), la tasa C:N ($r: 0.29$, p -valor: 0.0098), la tasa COT:N ($r: 0.26$, p -valor: 0.0184) y COS Stock ($r: 0.29$, p -valor: 0.0100).

En el caso del CbioWB, se hallaron correlaciones positivas mas no significativas con el CT ($r: 0.18$, p -valor: 0.1059), COT ($r: 0.19$, p -valor: 0.0899) y NT ($r: 0.22$, p -valor: 0.0564). En general, el CbioWB mostró valores altamente variables y poco confiables.

Por otra parte, para el CbioI, se encontraron correlaciones significativas con el CT ($r: 0.37$, p -valor: 0.0007), COT ($r: 0.29$, p -valor: 0.0097) y NT ($r: 0.46$, p -valor: 0.00002) (Anexo 3).

a. Relaciones con el carbono orgánico total (COT) y el carbono total (CT)

Se tiene una alta variabilidad debido a la heterogeneidad de las parcelas (Figura 14). Sin embargo, analizando las medianas, las cantidades de CT reportadas fueron mayores en el caso del uso de cultivo de maca y pastura tal como se observa en la Figura 15.

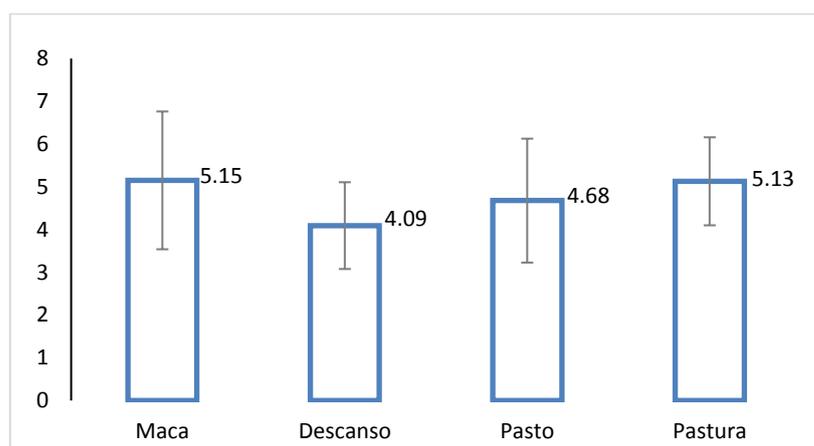


Figura 14: Porcentaje de CT promedio para los diferentes UAT.

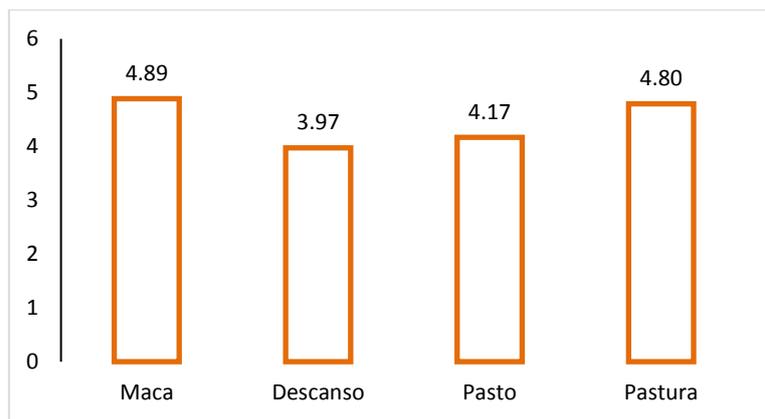


Figura 15: Porcentaje de CT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

Por otro lado, la cantidad de COT reportada fue mayor en el caso del uso de cultivo de maca. Esta diferencia se acentúa al evaluar las medianas, donde la diferencia del uso de maca respecto a pasto y suelo en descanso es mayor (Figuras 16 y 17).

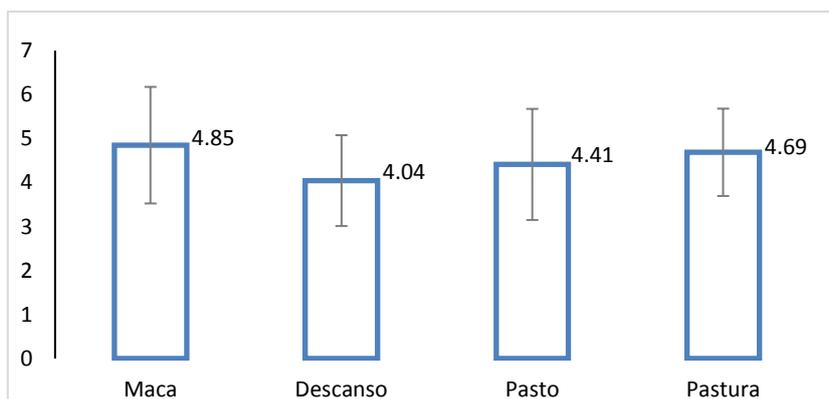


Figura 16: Porcentaje de COT promedio para los diferentes UAT.

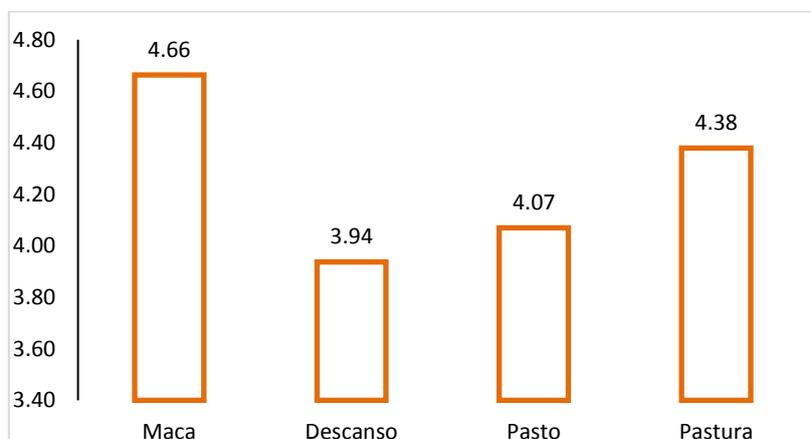


Figura 17: Porcentaje de COT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

Por lo general, se parte de la premisa de que el manejo agrícola convencional produciría pérdida de MOS, entre 16 % y 77 % según Knops y Tilman (2000). Esto debido a la disminución en la cantidad de biomasa vegetal que regresa al suelo y el aumento del proceso de descomposición inducido por el arado y el consecuente aumento de la aireación (Beheshti *et al.* 2012; Trasar-Cepeda *et al.* 2008). Así también, que el COT disminuiría considerablemente en los suelos cultivados en comparación con los sitios naturales (García-Orenes *et al.* 2010; Lal, 2002; Liu *et al.* 2010; McLauchlan 2006; Trasar-Cepeda *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2005).

Eclesia *et al.* (2012), señalan que el efecto del uso de pasturas en reemplazo de vegetación nativa, en cuanto al contenido de COS; dependería del tipo de vegetación nativa reemplazada, la edad a la que se realiza el muestreo y las condiciones ambientales.

Se analizó el Cbio de 11 parcelas de suelo en descanso, de los que se halló constituir un porcentaje no mayor al 0.59% del COT y el CT. El %Cbio respecto al COT y CT fue mayor en CbioI, esto por la mayor cantidad de Cbio cuantificada para estos suelos siguiendo esta metodología. Cabe resaltar el bajo valor reportado cuando se utilizó la metodología de Walkley - Black (Figura 18).

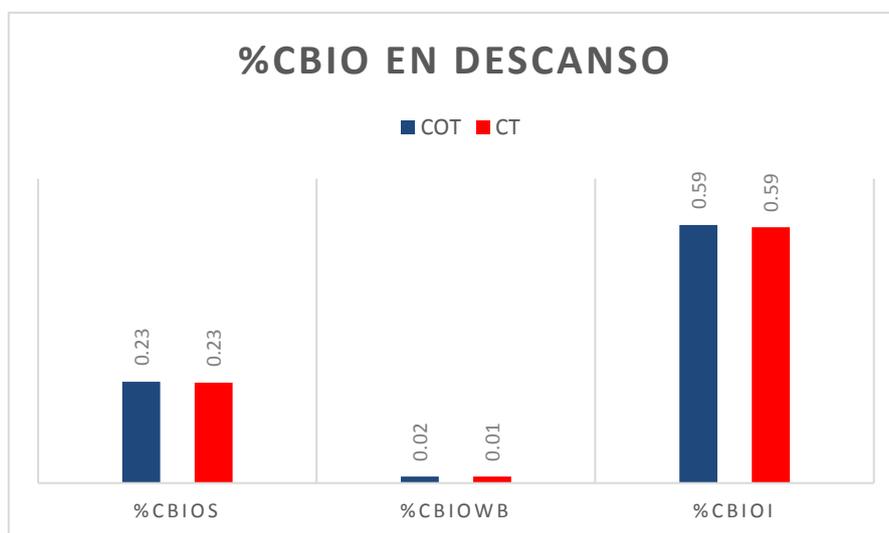


Figura 18: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de Suelo en descanso.

Por otro lado, se analizó cómo el CbioS se relacionaba con otros parámetros, siendo a su vez estudiado según cada UAT, dada su variabilidad intrínseca.

En la evaluación del CbioS de los suelos en descanso no se hallaron correlaciones significativas con el COT ni con el CT (Anexo 3), tal como se observa en las ecuaciones obtenidas:

$$\text{CbioS} = 268.2 + 103.5 * \text{COT} \quad (R^2 = 0.01215, \text{ p-valor: } 0.747)$$

$$\text{CbioS} = 372.47 + 76.84 * \text{CT} \quad (R^2 = 0.006465, \text{ p-valor: } 0.8142)$$

Es de observar que los suelos en descanso, pueden presentar una menor población microbiana, esto por el hecho de encontrarse en un estado de casi abandono. El porcentaje mayor encontrado con el método FI estaría explicado por la germinación de esporas de hongos, una población considerable en suelos altoandinos por el pH ácido, durante la fase de incubación. Tal como describen Rousk *et al.* (2009), el crecimiento fúngico y bacteriano están correlacionados negativamente en el rango de pH 4.5 y 8.3, siendo mayor la tasa hongos/bacterias a bajo pH.

De la misma manera, se analizó el Cbio en el suelo de 18 parcelas con cultivo de maca. El %Cbio respecto al COT y CT fue mayor con el método que empleó el analizador de C, de los que representó el 3.31% del COT y 3.16% del CT. Así también, es de considerar que la mayor cantidad de CbioS se encontró en estos suelos (Figura 19).

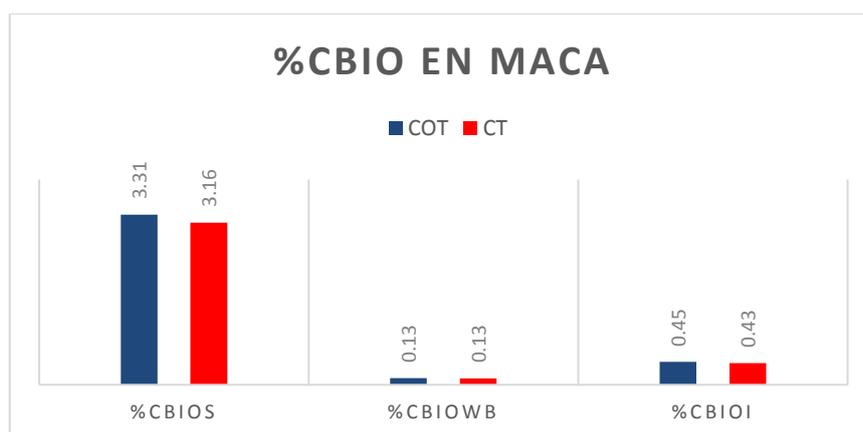


Figura 19: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de maca.

Para los suelos de maca se muestra una correlación positiva mas no significativa con el COT y el CT:

$$\text{CbioS} = 281.6 + 276.7 * \text{COT} \quad (R^2 = 0.2028, \text{ p-valor: } 0.0607)$$

$$\text{CbioS} = 657.3 + 187.7 * \text{CT} \quad (R^2 = 0.138, \text{ p-valor: } 0.1291)$$

La cantidad de COT y CT presente en los suelos de cultivo de maca resulta mayor debido a la aplicación de estiércol propia de un suelo agrícola, y que se dio en varias parcelas muestreadas.

Al cuantificar el Cbio de 36 parcelas de suelos con cultivo de pasto, el % Cbio respecto al COT y CT fue mayor con el método que hace uso del analizador de C. Este representó el 2.73% y 2.66% del COT y CT, respectivamente (Figura 20), lo cual es acorde a lo presentado por McGonigle *et al.* (2017), el cual refiere 2.7%. Otros investigadores como Gómez *et al.* (2012), presentan porcentajes de 1.48% y 1.76% en relación con el COT para pastos; Haider *et al.* (1991), muestran resultados de 1.94%, Xu *et al.* (2013) de 2.09%, los cuales son valores bajos al ser comparados con los hallados anteriormente.

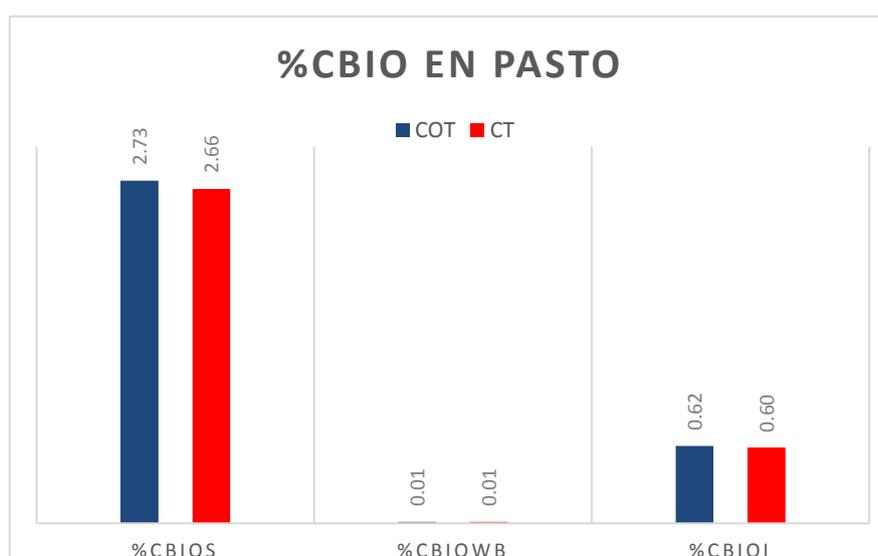


Figura 20: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pasto nativo.

El Cbio de pasto nativo presenta una correlación positiva y significativa con ambos parámetros:

$$\text{CbioS} = -331.5 + 348.8 * \text{COT} \quad (R^2 = 0.2292, \text{ p-valor: } 0.0031)$$

$$\text{CbioS} = -115.52 + 282.87 * \text{CT} \quad (R^2 = 0.1985, \text{ p-valor: } 0.0065).$$

Se trabajaron 14 parcelas de pastura, donde el porcentaje de Cbio respecto al COT y CT fue mayor con el método que utiliza el analizador de C (Figura 21).

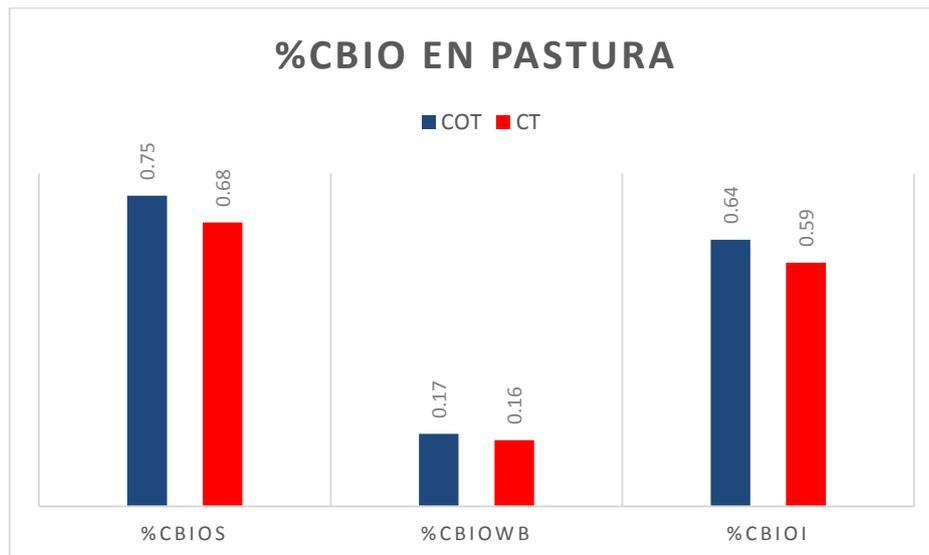


Figura 21: Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pastura cultivada.

El CbioS representó el 0.75% y 0.68% del COT y CT, respectivamente; mientras que el CbioI el 0.64% y 0.59%, según corresponde (Figura 21).

En el caso de los suelos pertenecientes a pasturas se obtuvo:

$$\text{CbioS} = 73.82 + 74.77 \cdot \text{COT} \quad (R^2 = 0.05709, \text{ p-valor: } 0.4107)$$

$\text{CbioS} = -660.46 + 211.55 \cdot \text{CT} \quad (R^2 = 0.4913, \text{ p-valor: } 0.0052)$, donde se observa una correlación significativa con el CT.

Las pasturas presentes en estos campos correspondían a *ryegrass* (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*), de los cuales el primero presenta una tasa de crecimiento más baja, correspondiente a una especie C3 por lo que se ha postulado tenga menor cantidad de C liberada a la rizósfera (Grayston *et al.* 1998), y por ende un menor Cbio.

Mientras, Echeverría *et al.* (1993) encuentran valores de 1.12 % para el valor de Cbio respecto al CT, autores como Schenk *et al.* (1995) indican valores de 2 a 3 %, para *ryegrass* y trébol blanco. Sin embargo, es de destacar que el pH de las pasturas estuvo alrededor de 6.72, lo cual es cercano a neutro y de lo cual se infiere presentaría una composición microbiana distinta, en la cual el porcentaje de hongos sería menor a los otros UAT, esto sumado a las condiciones climáticas adversas, resultaría en un menor porcentaje de CbioS y CbioWB.

Finalmente, se muestra la proporción que representaría el CbioS según cada UAT a manera de resumen (Figura 22).

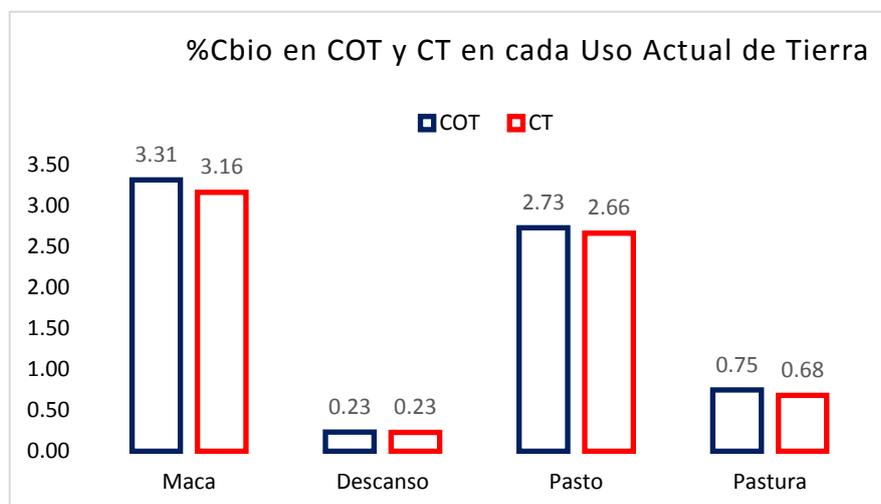


Figura 22: Porcentaje de Cbio respecto a cada UAT.

Estudios como los de Haider *et al.* (1991) hallaron cantidades que representaban del 1.35 a 3.32 % del COT; Sparling (1992), señaló que el Cbio puede constituir del 1 al 4% del COT y por su parte Vidal *et al.* (1997), refieren un 2.6% del COT.

Los resultados muestran que un suelo cultivado, pero con labranza mínima o cero, no afectaría indicadores de C como el Cbio. En este contexto, Hernández (2014) presentó que un sitio conservado tenía concentración de 5.9 mg COT/g suelo, mientras que una parcela de alfalfa tuvo 21.7 y en parcela abandonada se reportó 8.2. Ante esto refiere que el aumento en 267% de COT del sitio agrícola se debe posiblemente a la poca labranza y utilización de fertilizantes orgánicos (McLauchlan 2006), lo cual coincide con las prácticas de manejo agrícola en la puna peruana y en especial con el cultivo de maca.

b. Correlaciones con el nitrógeno total (NT)

La cantidad de NT hallado para los diferentes usos fue mayor en el uso de pastura y cultivo de maca; a pesar de ello, poseen alta variabilidad tal como se visualiza en el gráfico de barras (Figuras 23 y 24).

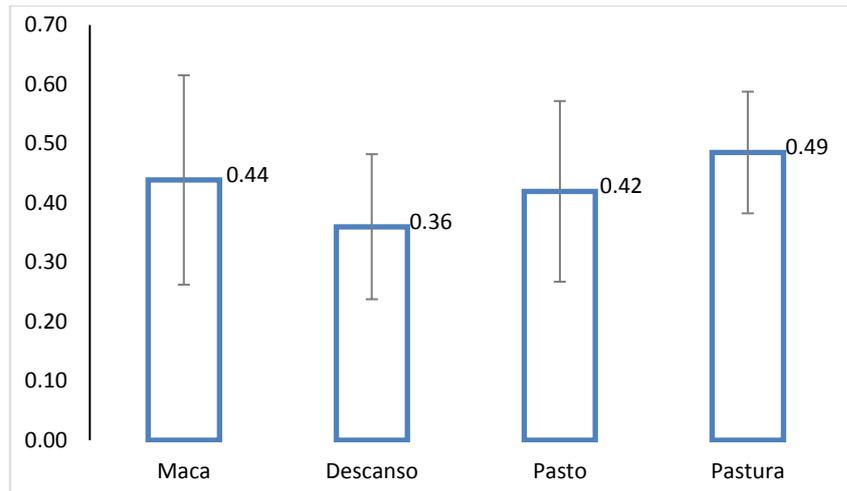


Figura 23: Porcentaje de NT promedio para los diferentes UAT.

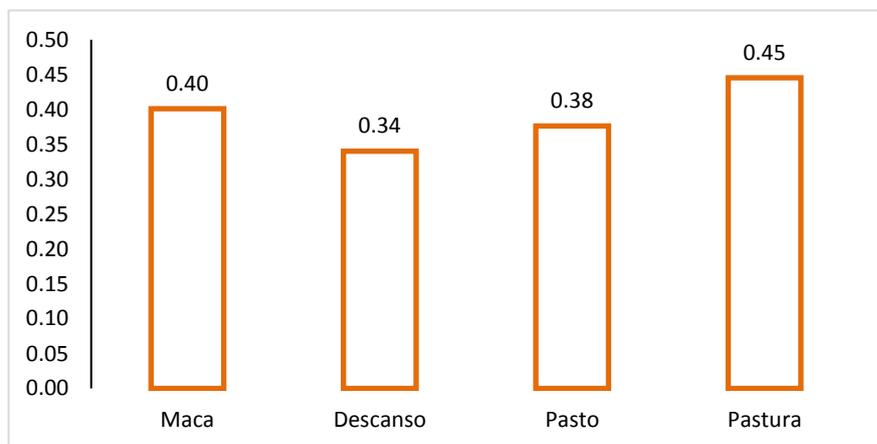


Figura 24: Porcentaje de NT en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

El uso de cultivos asociados de gramínea y leguminosa en pasturas, traería efectos beneficiosos en la conservación y productividad; así como, un menor costo ambiental y económico al disminuir la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Castro *et al.* 2009). Se han documentado mejoras en la estructura del suelo, tasas de drenaje y producción de biomasa en plantas cuando se usa trébol blanco (Mytton *et al.* 1993), el mismo que está presente en las pasturas evaluadas y guardaría estrecha relación con procesos de mineralización.

El CbioS de los suelos en descanso y de maca no mostraron correlación significativa con el NT, tal como lo muestran las ecuaciones:

$$\text{Descanso: CbioS} = 969.9 - 786.4 * \text{NT} \quad (R^2 = 0.009823, \text{ p-valor: } 0.7719)$$

$$\text{Maca: CbioS} = 1136.2 + 1111 * \text{NT} \quad (R^2 = 0.05801, \text{ p-valor: } 0.3357)$$

Para el suelo en descanso se tuvo alrededor de 0.34 %, mientras que para el suelo con cultivo de maca 0.4%. Dichos valores son mayores a los reportados por (Zúñiga 2010), donde se presentan porcentajes menores a 0.3 % para suelos destinados al cultivo de maca.

No obstante, en el caso del CbioS de pasto y pasturas, se observan correlaciones significativas: Pasto: $C_{bioS} = 222 + 2348.5 * NT$ ($R^2 = 0.151$, p-valor: 0.0192)

Pastura: $C_{bioS} = -768.9 + 2460.4 * NT$ ($R^2 = 0.659$, p-valor: 0.0004) (Anexo 3)

Para el suelo con pasto se obtuvo 0.38%, y para el suelo con pastura 0.45 % NT.

Pellegrini (2017) clasifica el contenido de N total, señalando que un suelo muy bien provisto presentaría un porcentaje mayor a 0.3%, haciendo la acotación de que un análisis más certero debe ser evaluado en el marco de condiciones edafoclimáticas y las propias al cultivo en cuestión.

Al ser el trébol blanco, una leguminosa, es de esperar asociaciones simbióticas con el género *Rhizobium*; estudios como los de Swanepoel *et al.* (2011) observan que más cantidad de N_2 es fijado en suelo con menor contenido de COS, y aunque se observara un contenido final de N en suelo menor, la consecuente senescencia de los nódulos permitiría un incremento del contenido de nitrógeno por la rizodeposición. Además, tal como mencionan Lopes *et al.* (2010), los ingresos orgánicos vegetales y animales contribuyen a un aumento de la MOS y con ello un impacto en los procesos biológicos del suelo.

c. Correlaciones con las relaciones C:N y COT:N

La relación de C:N fue mayor en el caso del cultivo de maca y en descanso. Al evaluar las medianas se visualiza la tendencia a un mayor valor en el suelo con maca (Figuras 25 y 26).

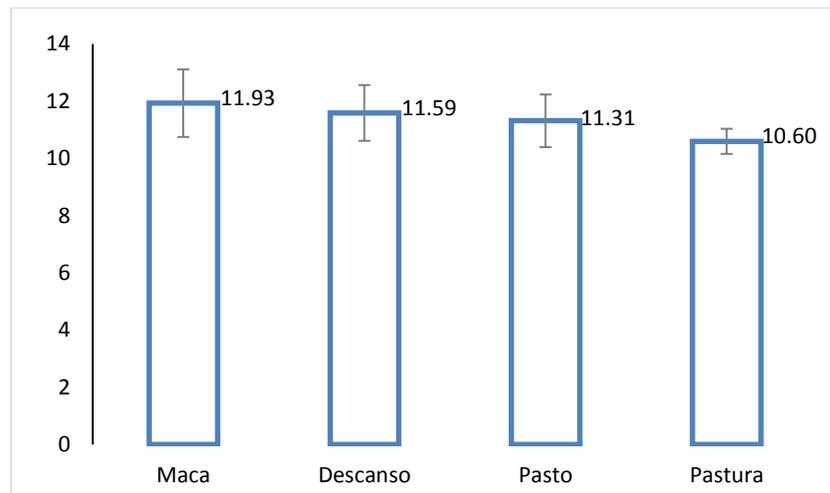


Figura 25: Relación C:N promedio para los diferentes UAT.

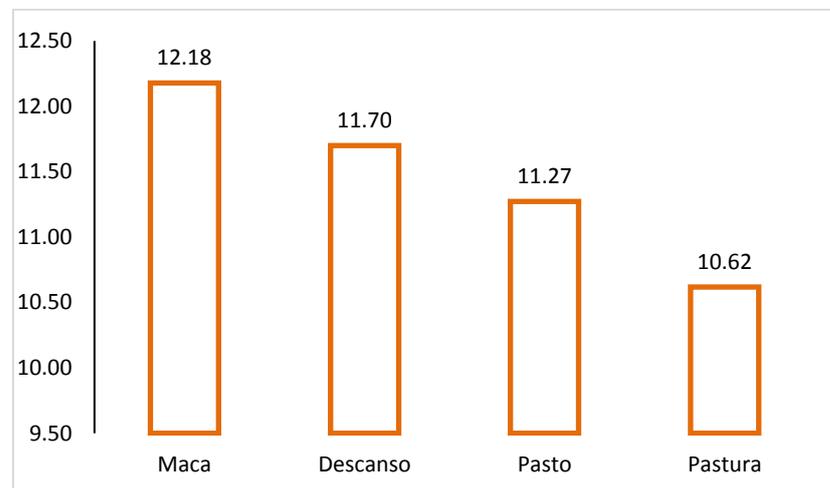


Figura 26: Relación C:N en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

De igual manera en la relación COT:N, se destaca un mayor valor en el uso de cultivo de maca en el análisis de medianas, seguido del suelo en descanso (Figuras 27 y 28).

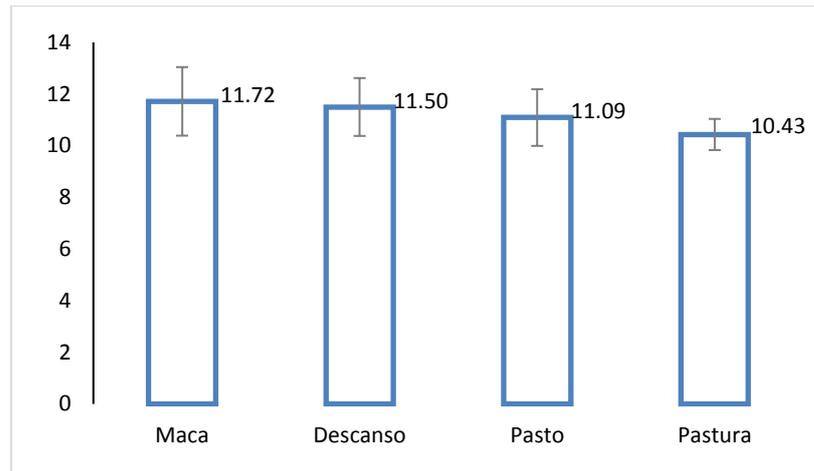


Figura 27: Relación COT:N promedio para los diferentes UAT.

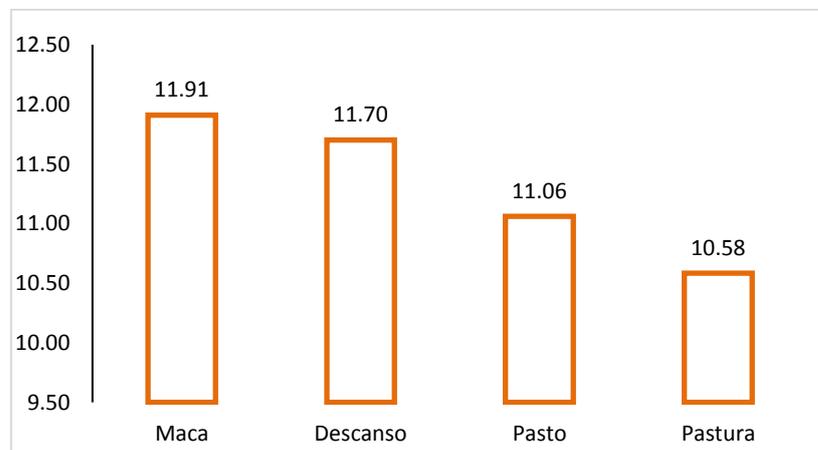


Figura 28: Relación COT:N en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

Las raíces y herbaje de las leguminosas usualmente poseen tasas de C:N, 13:1 y 20:1, por lo que tenderán a mineralizar N más rápidamente que los pastos (Chen *et al.* 2001). Los bajos valores obtenidos para los suelos de pastura son indicadores de procesos de mineralización que estarían aunados por el valor de pH 6.7 de los suelos de este uso, los cuales permitirían un mayor desarrollo bacteriano. Así también, las altas tasas de mineralización se esperan de formas lábiles de C, aquellas que estarían presentes en suelos de pastizales, tal como menciona Conti *et al.* (2014).

Con una relación C:N mayor a 25, los microorganismos degradarán si hay suficiente N disponible para ellos en el medio, causando una inmovilización temporal de éste. En cambio, cuando la relación C:N es baja, por ejemplo, menor a 20, la materia orgánica es degradada

fácilmente y el N es temporalmente inmovilizado dentro de los microorganismos, pero al morir, el N será liberado. Cuando la relación C:N se encuentra entre 20 y 25, mineralización e inmovilización estarán ocurriendo; sin embargo, terminarán liberando N al llegar a un equilibrio determinado (Cerrato *et al.* 2007).

El CbioS de los suelos correlacionó de la siguiente manera:

Cuadro 6. Correlaciones del CbioS con las relaciones C:N y COT:N

UAT	Ecuaciones
Descanso	$C_{bioS} = -5335.7 + 519.6 * CN$ ($R^2 = 0.2732$, p-valor: 0.0990)
	$C_{bioS} = -4392.6 + 441.8 * COT.N$ ($R^2 = 0.2606$, p-valor: 0.1086)
Maca	$C_{bioS} = -979.5 + 218.2 * CN$ ($R^2 = 0.1001$, p-valor: 0.2009)
	$C_{bioS} = -715.1 + 199.6 * COT.N$ ($R^2 = 0.1058$, p-valor: 0.1879)
Pasto	$C_{bioS} = 1047.03 + 14.16 * CN$ ($R^2 = 0.0002$, p-valor: 0.9346)
	$C_{bioS} = 835.01 + 33.57 * COT.N$ ($R^2 = 0.0016$, p-valor: 0.8167)
Pastura	$C_{bioS} = 4767 - 409.8 * CN$ ($R^2 = 0.3359$, p-valor: 0.0298)
	$C_{bioS} = 3699.9 - 313.9 * COT.N$ ($R^2 = 0.3718$, p-valor: 0.0206)

Las medianas de los resultados obtenidos se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 7: Relaciones C:N y COT:N para los UAT evaluados.

UAT	C:N	COT:N
Maca	12.2	11.9
Descanso	11.7	11.7
Pasto	11.3	11.1
Pastura	10.6	10.6

Mientras más bajas sean las tasas C:N, más rápida será la mineralización, proceso que se estaría llevando a cabo en los cuatro UAT.

d. Correlaciones con el COS Stock

La cantidad de COS Stock fue mayor en el caso del uso de pastura y cultivo de maca (Figuras 29 y 30).

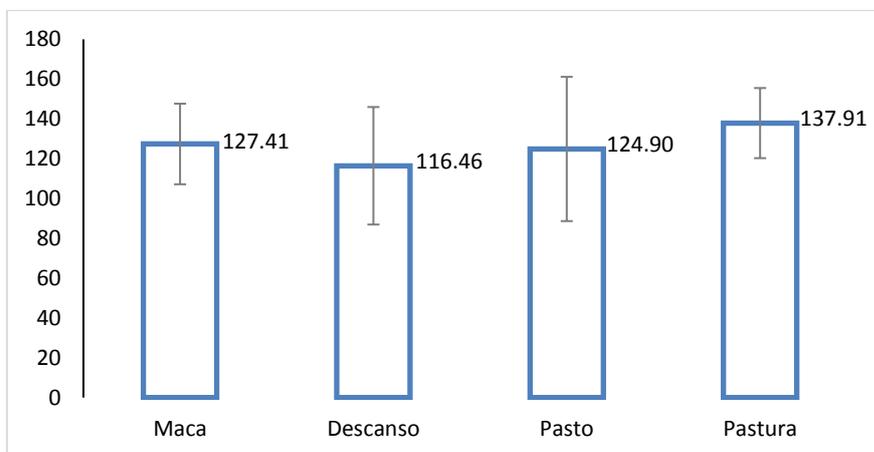


Figura 29: COS Stock (MgC.ha⁻¹) promedio para los diferentes UAT.

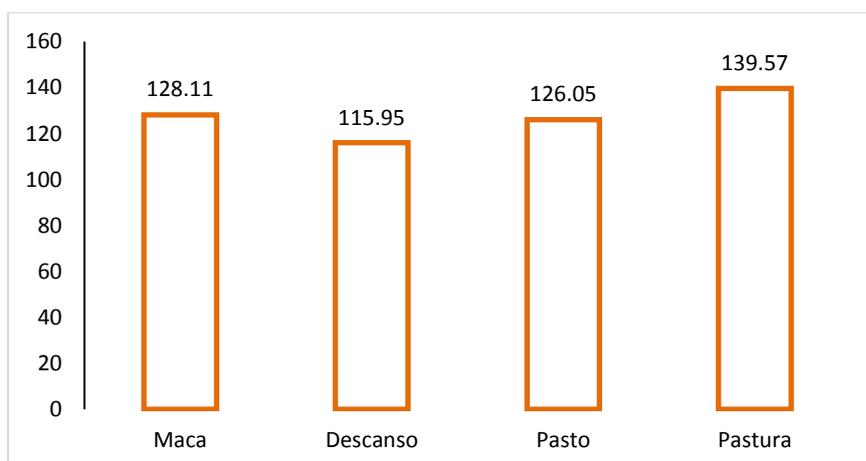


Figura 30: COS Stock (MgC.ha⁻¹) en el análisis de medianas para los diferentes UAT.

Las reservas de COS asociadas con diferentes sistemas agropecuarios dependerían de la tasa de ganancia o pérdida de C durante un período específico y, la cantidad máxima de C que los suelos pueden almacenar hasta que alcancen un nivel estable de COS. Pese al supuesto que se tiene sobre los pastos como sumideros de C, dicha afirmación no estaría relacionada al uso como pastos en sí, si no al manejo del suelo principalmente. Al ser los pastos mínimamente disturbados se espera un mayor contenido de COS Stock (Smith 2014).

Además, Guo y Gifford (2002) hallaron que el cambio de bosque natural a pastura no necesariamente disminuye el C Stock, si no que inclusive se incrementaría.

La alta producción de raíces explicaría por qué acumularían tanto C orgánico. Inclusive el pastoreo contribuiría al mismo debido a la muerte radicular siguiente a la defoliación.

En el almacén de C, se tiene una parte orgánica y otra inorgánica. La primera está compuesta de un conjunto heterogéneo de C, incluye fragmentos finos en descomposición, raíces y fauna del suelo, Cbio, productos de descomposición microbiana, materia orgánica particulada, etc. Mientras que la parte inorgánica comprende carbonatos y bicarbonatos (Jansson *et al.* 2010). Sin embargo, en el presente estudio el stock hace referencia al componente orgánico, dado que la presencia de carbonatos y bicarbonatos es mínima por la naturaleza de pH ácido de los suelos.

A continuación se presentan las correlaciones del CbioS con el COS Stock:

Cuadro 8. Correlaciones del CbioS con el COS Stock en los UAT

UAT	Ecuaciones
Descanso	$C_{bioS} = -481.42 + 10.03 * COS\ Stock$ ($R^2 = 0.0933$, p-valor: 0.3611)
Maca	$C_{bioS} = -729.182 + 18.466 * COS\ Stock$ ($R^2 = 0.2107$, p-valor: 0.0553)
Pasto	$C_{bioS} = 51.901 + 9.250 * COS\ Stock$ ($R^2 = 0.1327$, p-valor: 0.0290)
Pastura	$C_{bioS} = -544.502 + 7.025 * COS\ Stock$ ($R^2 = 0.1587$, p-valor: 0.1584)

V. CONCLUSIONES

1. Los pretratamientos de ajuste de humedad e incubación no afectaron el CbioS de forma significativa.
2. La refrigeración de los extractos de suelo afectó la cuantificación de Cbio.
3. Los diferentes métodos de determinación del Cbio arrojaron resultados variables por lo cual no son intercambiables.
4. El Cbio determinado con el analizador de C demuestra ser conveniente por su correlación con otros parámetros e indicadores de calidad del suelo.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda no hacer uso de la refrigeración de extractos previos a un análisis por la imprecisión de comportamiento y alteración de cantidad de Cbio cuantificable.
2. Para una mejor evaluación y ante una posible alta heterogeneidad de datos se recomienda una subdivisión de los espacios muestreados, incluso dentro de un mismo UAT, basada en una caracterización físico – química previa.
3. Se sugiere realizar correlaciones del CbioS con otras fracciones lábiles de C y otros indicadores de calidad del suelo.
4. Se considera necesario establecer condiciones estándar a lo largo de todos los procesos en los que se vea involucrada la muestra, desde la etapa inicial en que es muestreada hasta el análisis final del parámetro de interés.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M; Etchevers, JD; Monreal, C; Quednow, K; Hidalgo, C. 2001. Un método para la medición del carbono en los compartimentos subterráneos (raíces y suelo) de sistemas forestales y agrícolas en terrenos de ladera en México. Simposio Internacional Medición y Monitoreo de la Captura de Carbono en Ecosistemas forestales. 18 – 20 de Octubre del 2001. Valdivia-Chile. Disponible en: <https://www.uach.cl/procarbono/>.
- Alessi, DS; Walsh, DM; Fein, JB. 2011. Uncertainties in determining microbial biomass C using the chloroform fumigation - extraction method. *Chemical Geology* 280: 58-64.
- Alvear, M; Pino, M; Castillo, C; Trasar-Cepeda, C; Gil-Sotres, F. 2006. Efecto de la cero labranza sobre algunas actividades biológicas en un alfisol del sur de Chile. *J. Soil Sc. Plant. Nutr.* 6 (2): 38-53.
- Anderson, TH; Domsch, KH. 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry* 21: 471-479.
- Anderson, JPE; Domsch, KH. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 10, 215-21.
- Ayala, D. 2015. Vigor de shihuahuaco (*Dipteryx* spp.) y biomasa microbiana de suelos degradados en selva con dos biofertilizantes. Tesis Mg.Sc. Suelos, Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 62 p.
- Bao, X; Zhu, X; Chang, X; Wang, S; Xu, B; Luo, C, et al. 2016. Effects of Soil Temperature and Moisture on Soil Respiration on the Tibetan Plateau. *PLoS ONE* 11(10): e0165212. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165212>.
- Beheshti, A; Raiesi, F; Golchin, A. 2012. Soil properties, C fractions and their dynamics in land use conversion from native forests to croplands in northern Iran. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 148, 121–133.

- Blair, GJ; Lefroy, RDB; Lisle, L. 1995. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural systems. *Australian Journal of Agricultural Research* 46(7): 1459 – 1466.
- Brake, M; Höper, H; Joergensen, RG. 1999. Land use-induced changes in activity and biomass of microorganisms in raised bog peats at different depths. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1489-1497.
- Brookes, PC; Landman, A; Pruden, G; Jenkinson, DS. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 17: 837-842.
- Carter, MR; Gregorich, EG. 2008. *Soil sampling and methods of analysis*. 2nd Edition CRC Press, Taylor & Francis Group. pp 23-73.
- Carter, MR. 1991. Ninhydrin-reactive N released by the fumigation-extraction method as a measure of microbial biomass under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 23(2): 139-143.
- Carter, MR; Gregorich, EG; Angers, DA; Beare, MH; Sparling, GP; Wardle, DA; Voroney, R. P. 1999. Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Canadian Journal of Soil Science* 79:507-520.
- Castro, E; Mojica, JE; León, J; Pabón, M; Carulla, J; Cárdenas, E. 2009. Balance de nitrógeno en pastura de gramíneas y pastura de gramínea más *Lotus uliginosus* en la sabana de Bogotá, Colombia. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10(1): 91-101.
- Cerrato, ME; Leblanc HA; Kameko, C. 2007. Potencial de mineralización de nitrógeno de bokashi, compost y lombricompost producidos en la universidad Earth. *Tierra Tropical* 3(2): 183-197.
- Chalco, Y. 2007. Efecto de la quema de biomasa sobre el flujo de dióxido de carbono en la interfase atmósfera – Suelo en dos ubicaciones de la Selva Central del Perú. Tesis Ing. Quím., Huancayo, Perú, Universidad Nacional del Centro del Perú. 95 p.

- Chaudhry, V; Rehman, A; Mishra, A; Chauhan, PS; Nautiyal, CS. 2012. Changes in bacterial community structure of agricultural land due to long-term organic and chemical amendments. *Microbial ecology*, 64(2), Online. doi:10.1007/s00248-012-0025-y
- Chen, W; McCaughey, WP; Grant, CA; Bailey, LD. 2001. Pasture type and fertilization effects on soil chemical properties and nutrient redistribution. *Canadian Journal of Soil Science* 81(4): 395–404.
- Conti, ME; González, MG; Gómez, E; Ferrero Holtz, E; Moreno, G. 2014. Soil organic carbon fractions as influenced by soybean cropping in the humid pampa of Argentina. *Terra Latinoamericana* 32 (3): 195-200.
- Contin, M; Todd, A; Brookes, P. 2001. The ATP concentration in the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 33(4-5): 701–704.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). 2013. Guía de toma de muestras de suelo. Vinculación de conocimiento y tecnología. Disponible en: <http://web.corpoica.org.co/noticias/generales/>
- Craswell, ET; Waring, SA. 1972. Effect of grinding on the decomposition of soil organic matter—I. The mineralization of organic nitrogen in relation to soil type. *Soil Biology and Biochemistry* 4(4): 427-433.
- Crovetto, C. 1996. *Stubble over the soil*. American Society of Agronomy. Madison,WI, 264pp.
- Culman, SW; Snapp, SS; Freeman, MA; Schipanski, ME; Beniston, J; Lal, R; Drinkwater, LE; Franzluebbers, AJ; Glover, JD; Grandy, AS; Lee, J; Six, J; Maul, JE; Mirsky, SB; Spargo, JT; Wander, M.M. 2012. Permanganate oxidizable carbon reflects a processed soil fraction that is sensitive to management. *Soil Science Society of America Journal* 46: 1459-1466.
- Daglio, G; Sterren, M; Benintende, S. 2005. Almacenamiento de muestras de suelo: incidencias sobre la cuantificación de biomasa microbiana. *Agriscientia* 22(2): 63-68.
- Diaz-Zorita, M. 1999. Soil organic carbon recovery by the Walkley-Black method in a typic hapludoll. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30 (5, 6): 739-745.

- Echeverría, H; Bergonzi, R; Ferrari, J. 1993. Carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana de suelos del sudeste bonaerense. *Ciencias del Suelo* 10 (11): 36-41.
- Eclesia, RP; Jobbagy, EG; Jackson, RB; Biganzoli, F; Piñeiro, G. 2012. Shifts in soil organic carbon for plantation and pasture establishment in native forests and grasslands of South America. *Global Change Biology* 18: 3237–3251.
- Eyherabide, M; Saínz Rozas, H; Barbieri, P; Echeverría, HE. 2014. Comparación de métodos para determinar carbono orgánico en suelo. *Ciencia del Suelo* 32(1): 13-19.
- FAO. 2002. Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra. Informes sobre recursos mundiales de suelos. Basado en el trabajo de Michel Robert. Institut national de recherche agronomique. París, Francia. 61p.
- Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA). 2015. Guía de actividades prácticas, Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Córdoba. Disponible en: <http://www.agro.unc.edu.ar/~microbiologia/>
- Fierer, N; Schimel, JP. 2002. Effects of drying – rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 777-787.
- Fließbach, A; Mäder, P. 2000. Microbial biomass and size-density fractions differ between soils of organic and conventional agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 32(6): 757–768.
- Franzluebbers, AJ; Haney, RL; Hons, FM; Zuberer, DA. 1996. Determination of Microbial Biomass and Nitrogen Mineralization following Rewetting of Dried Soil. *Soil Science Society of America Journal* 60(4): 1133-1139.
- Fuentes, W; González, OJ. 2007. Estimación de la mineralización neta de nitrógeno del suelo en sistemas agroforestales y a pleno sol en el cultivo del café (*Coffea arabica* L.), en el Pacífico de Nicaragua, departamento de Carazo. Tesis Ing. Managua, Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. 97 p.
- Galantini, JA; Rosell, RA; Iglesias, JO. 1994. Determinación de materia orgánica empleando el método de Walkley y Black en fracciones granulométricas del suelo. *Ciencias del Suelo* 12: 81-83.

- García-Orenes, F; Guerrero, C; Roldán, J; Mataix-Solera, J; Cerdà, A; Campoy, M; Zornoza, R; Rcenas, G; Caravaca, F. 2010. Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research* 109(2): 110–115.
- Gattinger, A; Bausenwein, U; Bruns, C. 2004. Microbial biomass and activity in composts of different composition and age. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167: 556-561.
- Gattinger, A; Jawtusich, J; Muller, A; Mäder, P. 2011. No-till agriculture – a climate smart solution?. *Climate Change and Agriculture Report* N°2.
- Giller, KE; Corbeels, M; Nyamangara, J; Triomphe, B; Affholder, F; Scopel, E; Tittonell, P. 2011. A research agenda to explore the role of conservation agriculture in African smallholder farming systems. *Field Crops Research* 124 (3): 468-472.
- Gobierno Regional de Junín. 2015. Zonificación Ecológica Económica. Junín: Gobierno Regional de Junín. Disponible en: <https://siar.regionjunin.gob.pe/>
- Gómez-Jorin, LA; Morales-Valdes, A; Dueñas-Vega, G; Dantin-Martínez; JM; Chávez-Gonzalez, N; Torres-Leblanch, M. 2012. Contenido de carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana en suelos de La Habana. *Agronomía Mesoamericana* 23 (1): 179-187.
- Gonçalves, A; Monteiro, M; Guerra, J; De Polli, H. 2002. Microbial biomass in air dried and rewetted soil samples. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37: 651-658.
- Grayston, SJ; Campbell, CD; Lutze, JL; Gifford, RM. 1998. Impact of elevated CO₂ on the metabolic diversity of microbial communities in N-limited grass swards. *Plant and Soil* 203(2): 289–300.
- Gregorich, EG; Carter, MR; Angers, DA; Monreal, CM; Ellert, BH. 1994. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 74: 367-385.
- Guerrero, C; Mataix-Solera, J; Rodríguez, F; García- Orenes, F; Gómez, I; Moral, R. 2003. Carbono microbiano edáfico en suelos afectados por fuego y enmendados con diferentes residuos orgánicos. *Edafología* 10 (2): 185-190.

- Guo LB; Gifford, RM. 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Global Change Biology* 8: 345-360.
- Haider, J; Marumoto, T; Kalam Azad, A. 1991. Estimation of Microbial Biomass Carbon and Nitrogen in Bangladesh Soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37 (4): 591-599.
- Hao, X; Ball, BC; Culley, JLB; Carter, MR; Parkin, GW. 2008. Soil density and porosity. In: Gregorich, E.G., Carter, M.R. (Eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. Second edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 744-747.
- Hartmann, M; Widmer, F. 2006. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12): 7804–7812
- Haynes, RJ. 1999. Labile organic matter fractions and aggregate stability under short-term, grass-based leys. *Soil Biology and Biochemistry* 31(13): 1821-1830.
- Haynes, RJ. 2000. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 211-219.
- Hernández, N. 2014. Dinámica de C, N y P y composición de la comunidad bacteriana del suelo de un gradiente de manejo agrícola en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis para obtener el título de licenciado en Ciencias Ambientales. Universidad Nacional Autónoma de México. Michoacán - México.
- Högberg, MN; Högberg, P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791–795.
- Houghton, R. 2012. Historic changes in terrestrial carbon storage, in: Lal, R., Lorenz, K., Hüttl, R.F., Schneider, B.U., von Braun, J. (Eds.), *Recarbonization of the Biosphere*. Springer, Dordrecht, pp. 59–82.
- Hussain, I ; Olson, R. 2000. Recovery rate of organic carbon in organic matter fractions of Grantsburg soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (7, 8): 995-1001.
- Insam, H; Parkinson, D; Domsch, KH. 1989. Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 21: 211-221.

- Inubushi, K; Brookes PC; Jenkinson DS. 1991. Soil microbial biomass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extraction method. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 737-741.
- Jangid, K; Williams, M; Franzluebbers, A; Sanderlin, J; Reeves, J; Jenkins, M; Endale, D; Coleman, D; Whitman, W. 2008. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (11): 2843-2853.
- Jansson, C; Wullschleger, SD; Kalluri, UC; Tuskan, GA. 2010. Phytosequestration: Carbon Biosequestration by Plants and the Prospects of Genetic Engineering. *BioScience*. 60 (9): 685-696.
- Jenkinson, DS; Ladd, JN. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. En: Paul, EA; Ladd, JN. (Eds.) *Soil Biochemistry*, vol. 5. Dekker, New York, pp. 415-471.
- Jenkinson, DS; Powlson, DS. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 8: 167-177.
- Jenkinson, DS. 1988. Determination of soil microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems* (J. R. Wilson, Ed.), pp. 368-386. CAB International, Wallingford.
- Jenkinson, DS; Brookes, PC; Powlson, DS. 2004. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 5-7.
- Joergensen, RG; Brookes, PC. 1991. Soil microbial biomass estimations by fumigation extraction. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 66: 511-514.
- Joergensen, RG. 1996. The fumigation - extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the kEC value. *Soil Biology & Biochemistry* 28 (1): 25-31.
- Joergensen, RG; Wu, J; Brookes, PC. 2011. Measuring soil microbial biomass using an automated procedure. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 873-876.
- Jolivet, C; Arrouays, D; Bernoux, M. 1998. Comparison between analytical methods for organic carbon and organic matter determination in sandy spodosols of France. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29 (15, 16): 2227-2233.

- Josse, C; Cuesta, F; Navarro, G; Barrena, V; Cabrera, E; Chacón-Moreno, E; Ferreira, W; Peralvo, M; Saito, J; Tovar, A. 2009. Ecosistemas de los Andes del Norte y Centro. Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional ECOBONA-Intercooperation, CONDESAN-Proyecto Páramo Andino, Programa BioAndes, EcoCiencia, NatureServe, IAvH, LTA-UNALM, ICAE-ULA, CDC-UNALM, RUMBOL SRL. Lima, Perú.
- Kaiser, EA; Mueller, T; Joergensen RG; Insam H; Heinemeyer O. 1992. Evaluation of methods to estimate the soil microbial biomass and the relationship with soil texture and organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 24: 675-683.
- Kieft, TL; Soroker, E; Firestone, MK. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biology & Biochemistry* 19 (2): 119–126.
- Klaus, U; Mohamed, S; Volk, M; Spiteller, M. 1998. Interaction of aquatic humic substances with anilazine and its derivatives: The nature of the bound residues. *Chemosphere* 37: 341-361.
- Knops, JMH; Tilman, D. 2000. Dynamics of soil nitrogen and carbon accumulation for 61 years after agricultural abandonment. *Ecology* 81 (1): 88-98.
- Kolář, L; Vaněk, V; Kužel, S; Peterka, J ; Borová-Batt, J; Pezlarová, J. 2011. Relationships between quality and quantity of soil labile fraction of the soil carbon in Cambisols after liming during a 5-year period. *Plant Soil Environ.* 57(5): 193–200.
- Krishnan, G; Srivastav, SK; Kumar, S; Saha, SK; Dadhwal, VK. 2009. Quantifying the underestimation of soil organic carbon by the Walkley and Black technique – examples from Himalayan and central Indian soils. *Current Science* 96 (8): 1133-1137.
- Lal, R. 2002. Soil carbon dynamics in cropland and rangeland. *Environmental pollution* 116 (3): 353-362.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304:1623-1628.

- Lao, C. 2017. Fracciones de carbono orgánico del suelo en sistemas agroforestales y diferentes usos del suelo en la amazonía peruana. Tesis Mg.Sc. Suelos, Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 64 p.
- Larson, WE; Pierce, FJ. 1991. Conservation and enhancement of soil quality. Evaluation for sustainable land management in the developing world. Vol2. IBSRAM. Proc. 12, 2. Technical papers, International Board for Soil Research and Management, Bangkok, Thailand, pp. 175 – 203.
- Liu, X; Li, FM; Liu, DQ; Sun, GJ. 2010. Soil organic carbon, carbon fractions and nutrients as affected by land use in semi-arid region of Loess Plateau of China. *Pedosphere* 20(2): 146–152.
- Lopes, MM; Salviano, AAC; Araujo, ASF; Nunes, LAPL; Oliveira, ME. 2010. Changes in soil microbial biomass and activity in different Brazilian pastures. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(4): 1253-1259.
- Lucas, ST; Weil, RR. 2012. Can a labile carbon test be used to predict crop responses to improved soil organic matter management?. *Agronomy Journal* 104(4): 1160-1170.
- Lupwayi, NZ; Rice, WA; Clayton, GW. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 30(13): 1733–1741.
- Lynch, JM; Panting, LM. 1980. Cultivation and the soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 12(1): 29–33.
- Martens, R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils* 19: 87-99.
- McDowell, JZ; Hess, JJ. 2012. Accessing adaptation: multiple stressors on livelihoods in the Bolivian highlands under a changing climate. *Global Environ. Change* 22: 342-352.
- McGonigle, TP; Turner, WG. 2017. Grasslands and Croplands Have Different Microbial Biomass Carbon Levels per Unit of Soil Organic Carbon. *Agriculture* 7: 57. DOI: 10.3390/agriculture7070057.
- McLauchlan , KK. 2006. The Nature and Longevity of Agricultural Impacts on Soil Carbon and Nutrients: A Review. *Ecosystems* 9(8): 1364–1382.

- Mytton, LR; Cresswell, A; Colbourn, P. 1993. Improvement in soil structure associated with white clover. *Grass and Forage Science* 48 (1): 84-90.
- Nannipieri, P; Ascher, J; Ceccherini, MT; Landi, L; Pietramellara, G; Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655-670.
- Nelson, DW; Sommers, LE. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. En: Page, AL; Miller, RH; Keeney, DR. 1982. *Methods of soil analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, pp: 539-579.
- Nelson, DW; Sommers, LE. 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series no.5, pp. 961-1010.
- Nielsen, MN; Winding, A. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report N° 388.
- Ocio, JA; Brookes, PC. 1990. An evaluation of methods for measuring the microbial biomass in soils following recent additions of wheat straw and the characterization of the biomass that develops. *Soil Biol Biochem* 22:685-694.
- Pankhurst, CE; Hawke, BG; McDonald, HJ; Kirkby, CA; Buckerfield, JC; Michelsen, P; O'Brien, KA; Gupta, VVSR; Doube, BM. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35:1015-1028.
- Parton, WJ; Schimel, DS; Cole, CV; Ojima, DS. 1987. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grasslands¹. *Soil Science Society of America Journal* 51 (5): 1173-1179.
- Pellegrini; AE. 2017. Macronutriente del Suelo: Nitrógeno (En línea). Consultado 20 oct. 2019. Disponible en http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35406/mod_resource/content/1/TEMA%2012%20-%20NITROGENO.pdf.
- Perez, C; Nicklin, C; Dangles, O; Vanek, S; Sherwood, S; Halloy, S; Garret, K; Forbes, G. 2010. Climate change in the high andes: implications and adaptation strategies for small-scale farmers. *Int. J. Environ. Cult. Econ. Soc. Sustain.* 6: 71-88.

- Périé, C. y Ouimet, R. 2008. Organic carbon, organic matter and bulk density relationships in boreal forest soils. *Canadian Journal of Soil Science* 88: 315-325.
- Pesaro, M; Nicollier, G; Zeyer, J; Widmer, F. 2004. Impact of Soil Drying – Rewetting Stress on Microbial Communities and Activities and on Degradation of Two Crop Protection Products. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5): 2577-2587.
- Powlson, D; Brookes, P; Chistensen, B. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology & Biochemistry* 19:159-164.
- Powlson, DS; Bhogal, A; Chambers, BJ; Coleman, K; Macdonald AJ; Goulding, KWT; Whitmore, AP. 2012. The potential to increase soil carbon stocks through reduced tillage or organic material additions in England and Wales: A case study. *Agr. Ecosyst. Environ.* 14: 23-33
- Prasad Datta, S; Kumar Rattan, R; Chandra, S. 2010. Labile soil organic carbon, soil fertility and crop productivity as influenced by manure and mineral fertilizers in the tropics. *Plant Nutrition and Soil Science* 173: 715 – 726.
- R Core Team. 2016. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, R foundation for statistical computing. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raiesi, F. 2012. Soil properties and C dynamics in abandoned and cultivated farmlands in a semi-arid ecosystem. *Plant and soil* 351(1-2): 161–175.
- Ramnarine, R; Voroney, RP; Wagner-Riddle, C; Dunfield, KE. 2011. Carbonate removal by acid fumigation for measuring the $\delta^{13}\text{C}$ of soil organic carbon. *Can. J. Soil Sci.* 91: 247-250.
- Riepert, F; Felgentreu, D. 2002. Relevance of soil storage to biomass development, N-mineralisation and microbial activity using the higher plant growth test, ISO 11269-2, for testing of contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 20 (1): 57–68.
- Rocha, J. 2011. Agricultural intensification, market participation, and household demography 2016 in the Peruvian Andes. *Hum. Ecol.* 39: 555-568.

- Rolando, JL. 2016. Land-use change impacts on soil fertility and carbon sequestration: A case study in the Peruvian Puna grasslands. MSc tesis, Florida, USA, University of Florida.
- Rolando, JL; Turin, C; Ramírez, DA; Mares, V; Moneris, J; Quiroz, R. 2017. Key ecosystem services and ecological intensification of agriculture in the tropical high-Andean Puna as affected by land-use and climate changes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 236: 221-233.
- Ross, DJ. 1987. Soil microbial biomass estimated by the fumigation-incubation procedure: Seasonal fluctuations and influence of soil moisture content. *Soil Biol Biochem* 19 (4): 397–404.
- Rousk, J; Brookes, PC; Bååth, E. 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75(6): 1589–1596.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2012. Guías y Manuales (en línea). Consultado: 24 oct. 2019. Disponible en <http://www.sag.cl/tipo-de-publicacion/guias-y-manuales?page=11>.
- Schenk, U; Manderscheid, R; Hugen, J; Weigel, HJ. 1995. Effects of CO₂ enrichment and intraspecific competition on biomass partitioning, nitrogen content and microbial biomass carbon in soil of perennial ryegrass and white clover. *Journal of Experimental Botany* 46 (289): 987-993,
- Scholle, G; Wolters, V; Joergensen, RG. 1992. Effects of mesofauna exclusion on the microbial biomass in two moder profiles. *Biology and Fertility of Soils* 12: 253-260.
- Schollenberger. 1927. A rapid approximate method for determining soil organic matter. *Soil Science* 24: 65-68.
- Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). 2013. Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos. Centro Agropecuario “ La Granja” Espinal, Tolima. Consultado 22 mar. 2019. Disponible en <https://repositorio.sena.edu.co>.

- Shen, SM; Brookes, PC; Jenkinson, DS. 1987. Soil respiration and the measurement of microbial biomass C by the fumigation technique in fresh and air-dried soil. *Soil Biol Biochem* 19: 53-158.
- Shimadzu. 2019 (en línea, sitio web). Consultado 27 oct. 2019. Disponible en <https://www.shimadzu.com/an/toc/lab/toc-14.html/lab/toc-14.html>.
- Shishido, M; Chanway, CP. 1998. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (7): 939-947.
- Silberberg, MS. 2012. *Principles of General Chemistry*. 3rd Edition. Published by McGraw-Hill.
- Smith, P. 2014. Do grasslands act as a perpetual sink for carbon?. *Global Change Biology* 20 (9): 2708-2711.
- Soon, YK; Abboud, S. 1991. A comparison of some methods for soil organic carbon determination. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 22: 947-954.
- Sparling, GP. 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 30 (2): 195-207.
- Soil Survey Staff. 2014. *Keys to Soil Taxonomy*. 11 ed. Washington, DC.: Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture (USDA).
- Stenberg, B; Johansson, M; Pell, M; Sjobahl-Svensson, K; Stenstrom, J; Tortensson, L. 1998. Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biol. Biochem* 30 (3): 393 – 402.
- Swanepoel, PA; Botha, PR; Truter, WF; Surridge-Talbot, AKJ. 2011. The effect of soil carbon on symbiotic nitrogen fixation and symbiotic *Rhizobium* populations in soil with *Trifolium repens* as host plant. *African Journal of Range and Forage Science* 28 (3): 121-127.
- Tate, KR; Ross, DJ; Feltham, CW. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology & Biochemistry* 20: 329-335.

- Tirol – Padre, A; Ladha, JK. 2004. Assessing the reliability of permanganate – oxidizable carbon as an index of soil labile carbon. *Soil Science Society of America Journal* 68: 969 – 978.
- Tiurin, IV. 1935. Comparative study of the methods for the determination of organic carbon in soils and water extracts of soils. Dokuchaiv Soil Institute. *Studies Genesis Georgia Soils*, 1935: 139-158.
- Toyota, K; Ritz, K; Young, IM. 1996. Survival of bacterial and fungal populations following chloroform-fumigation: effects of soil matric potential and bulk density. *Soil Biol Biochem* 28:1545–1547.
- Trasar-Cepeda, C; Leirós, MC; Seoane, S; Gil-Sotres, F. 2008. Biochemical properties of soils under crop rotation. *Applied Soil Ecology* 39(2): 133–143.
- Van Gestel, M; Merckx, R; Vlassak, K. 1993. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: The fate of fast- and slow- growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biology and Biochemistry* 25 (1): 109-123.
- Vance, ED; Brookes, PC; Jenkinson, DS. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass carbon. *Soil Biology & Biochemistry* 19: 703-707.
- Vance, ED; Brookes, PC; Jenkinson, DS. 1991. Confirmation of a relationship between the size of non-hyphal organisms and their contribution to soil biovolume. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 1097–1098.
- Vidal, I; Etchevers, J; Fischer, A. 1997. Biomasa microbiana en un suelo sometido a diferentes manejos de labranza y rotación. *Agricultura Técnica (Chile)*. 57:272-281.
- Vuille, M; Keimig, F. 2004. Interannual variability of summertime convective cloudiness and precipitation in the central Andes derived from ISCCP-B3 data. *Journal of Climate* 17: 3334-3348.
- Walkley, A; Black, IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29-38.
- Wardle, DA; Parkinson, D. 1991. A statistical evaluation of equations for predicting total microbial biomass carbon using physiological and biochemical methods. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 34: 75-86.

- Weil, RR; Islam, KR; Stine, MA; Gruver, JB; Samson-Liebig, SE. 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *American Journal of Alternative Agriculture* 18 (1): 3-17.
- West, TO; Post, WM. 2002. Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation: a global data analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 1930-1946.
- Witt, C; Gaunt, JL; Galicia CC; Ottow, JCG; Neue, HU. 2000. A rapid chloroform - fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biol. Fertil. Soils* 30: 510-519.
- Wu, J; Joergensen, RG; Pommerening, B; Chaussod, R; Brookes, PC. 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction-an automated procedure. *Soil Biology & Biochemistry* 22:1167-1169.
- Xu, X; Thornton, PE; Post, WM. 2013. A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography* 22: 737-749.
- Zagal, E. 1993. Measurement of microbial biomass in rewetted air-dried soil by fumigation-incubation and fumigation-extraction techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 25: 553-559.
- Zelles, L; Adrian, P; Bai, QY; Stepper, K; Adrian, MV; Fischer, K; Maier, A; Ziegler, A. 1991. Microbial activity measured in soils stored under different temperature and humidity conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(10): 955–962.
- Zhao, W; Xiao, H; Liu, Z; Li, J. 2005. Soil degradation and restoration as affected by land use change in the semiarid Bashang area, northern China. *Catena* 59(2): 173–186.
- Ziqun, H; Xu, Z; Chen, C. 2008. Effect of mulching on labile soil organic matter pools, microbial community functional diversity and nitrogen transformations in two hardwood plantations of subtropical Australia. *Applied Soil Ecology* 40: 229-239.
- Zúñiga, D. 2010. Caracterización y selección de bacterias promotoras d crecimiento en el cultivo orgánico de maca (*Lepidium meyenii* Walpers) como herramienta biotecnológica para mejorar su calidad productiva. Proyecto PERÚ BIODIVERSO – CONCYTEC – GTZ 2009.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Estadística en el Efecto del Pretratamiento y refrigeración de extractos por 24 horas (primer ensayo).

Test de Normalidad de Shapiro-Wilk

W = 0.98195, p-value = 0.9679

Tabla de Análisis de Variancia

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ID	5	89544102	17908820	24.352	6.78e-06 ***
Residuals	12	8824956	735413		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Test HSD

Mean Square Error: 735413

ID, means

	BMS	std r	Min	Max
I	3224.200	421.0675 3	2926.9333	3706.033
II	2468.620	603.2973 3	1816.9200	3007.620
III	1736.723	718.2638 3	938.0233	2329.623
IV	3764.833	827.5634 3	2990.6333	4637.033
V	5610.500	653.5211 3	5228.3000	6365.100
VI	8401.377	1497.7845 3	6756.6100	9686.810

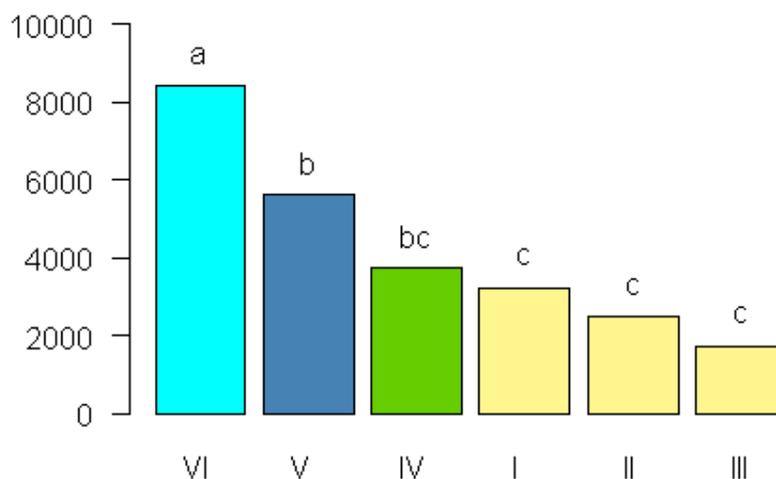
alpha: 0.05 ; Df Error: 12

Critical Value of Studentized Range: 4.750231

Honestly Significant Difference: 2351.905

Groups, Treatments and means

a	VI	8401
b	V	5610
bc	IV	3765
c	I	3224
c	II	2469
c	III	1737



Anexo 2: Estadística en el Efecto de la refrigeración de extractos por 11 días (Segundo ensayo)

Correlaciones del Cbio (extractos refrigerados BMSR y no refrigerados BMS) y el Carbono orgánico total (COT) y Carbono oxidable en permanganato (POXC)

	ID	BMSR	BMS	COT	POXC
ID	1.00	-0.27	0.23	0.27	0.30
BMSR	-0.27	1.00	0.76	0.40	0.53
BMS	0.23	0.76	1.00	0.58	0.74
COT	0.27	0.40	0.58	1.00	0.93
POXC	0.30	0.53	0.74	0.93	1.00

p-value

	ID	BMSR	BMS	COT	POXC
ID	1.0000000	0.342255135	0.438246204	3.495257e-01	3.020161e-01
BMSR	0.3422551	1.000000000	0.001452967	1.516617e-01	5.073439e-02
BMS	0.4382462	0.001452967	1.000000000	2.987349e-02	2.542057e-03
COT	0.3495257	0.151661715	0.029873494	1.000000e+00	1.155193e-06
POXC	0.3020161	0.050734386	0.002542057	1.155193e-06	1.000000e+00

Modelos

BMSR ~ BMS

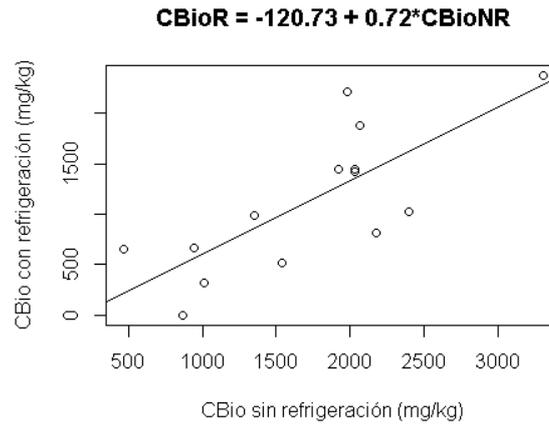
Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-644.40	-430.44	98.93	165.71	898.71

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-120.7315	328.7530	-0.367	0.71983
BMS	0.7242	0.1763	4.107	0.00145 **

Residual standard error: 472.6 on 12 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.5844, Adjusted R-squared: 0.5497
 F-statistic: 16.87 on 1 and 12 DF, p-value: 0.001453



COT~BMSR

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.52386	-0.35400	-0.01761	0.35661	0.63751

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.4905015	0.2249987	2.180	0.0499 *
BMSR	0.0002620	0.0001711	1.531	0.1517

Residual standard error: 0.4346 on 12 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.1634, Adjusted R-squared: 0.09372
 F-statistic: 2.344 on 1 and 12 DF, p-value: 0.1517

POXC~BMSR

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-244.26	-83.18	-41.20	131.08	305.33

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	315.90941	89.53956	3.528	0.00416 **
BMSR	0.14784	0.06811	2.171	0.05073 .

Residual standard error: 173 on 12 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.2819, Adjusted R-squared: 0.2221
 F-statistic: 4.712 on 1 and 12 DF, p-value: 0.05073

COT ~ BMS

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.69445	-0.25696	0.03739	0.29945	0.54243

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.1729939	0.2693791	0.642	0.5328
BMS	0.0003558	0.0001445	2.463	0.0299 *

Residual standard error: 0.3873 on 12 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.3358, Adjusted R-squared: 0.2804
 F-statistic: 6.066 on 1 and 12 DF, p-value: 0.02987

POXC ~ BMS

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-----	----	--------	----	-----

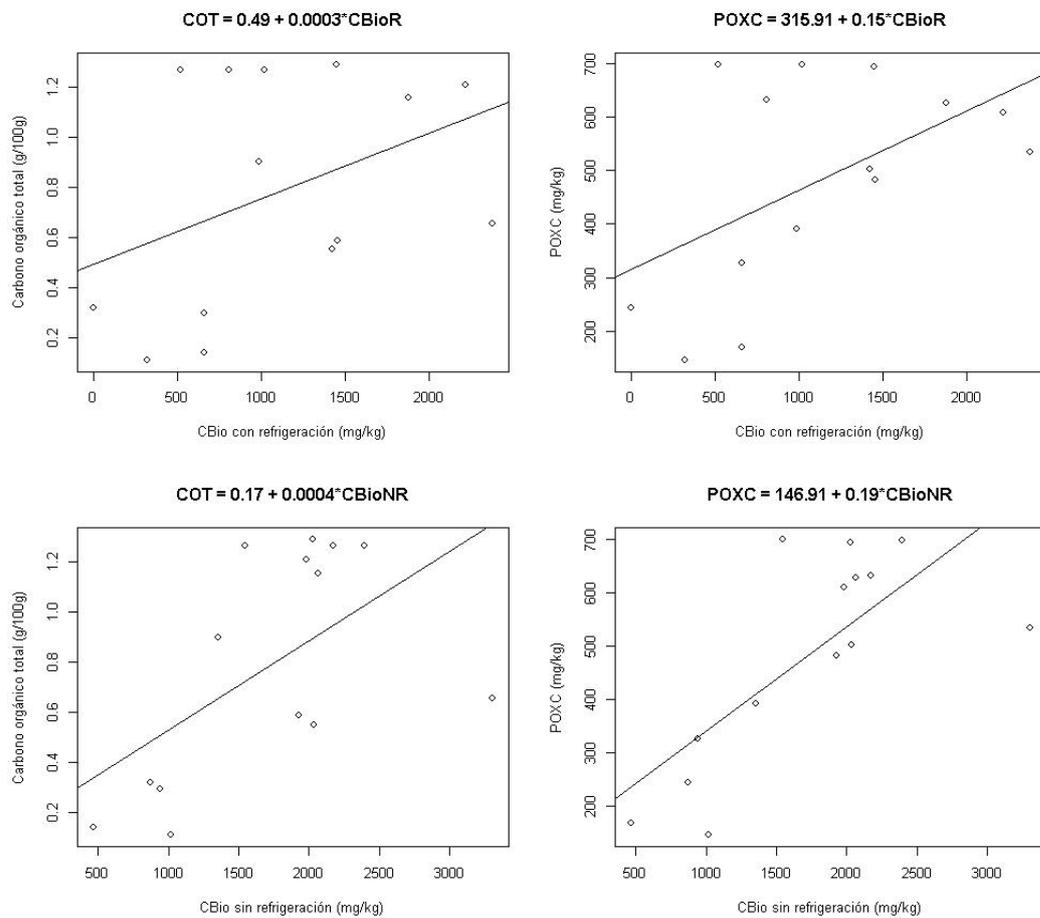
-257.72 -61.28 -11.58 77.46 250.64

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	146.91137	95.68416	1.535	0.15063
BMS	0.19487	0.05132	3.797	0.00254 **

Residual standard error: 137.6 on 12 degrees of freedom
 Multiple R-squared: 0.5458, Adjusted R-squared: 0.5079
 F-statistic: 14.42 on 1 and 12 DF, p-value: 0.002542

Gráficos de modelos



Comparaciones

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-923.80	-173.56	-5.98	224.84	800.65

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	1994.80	161.07	12.385	< 2e-16 ***
TRATR	-511.92	83.17	-6.155	4.35e-08 ***
IDII	-841.82	220.06	-3.825	0.000283 ***
IDIII	-1138.23	220.06	-5.172	2.16e-06 ***

IDIV	215.11	220.06	0.978	0.331730	
IDIX	58.23	220.06	0.265	0.792103	
IDV	-614.46	220.06	-2.792	0.006766	**
IDVI	874.00	220.06	3.972	0.000173	***
IDVII	-1038.60	220.06	-4.720	1.20e-05	***
IDVIII	285.02	220.06	1.295	0.199572	
IDX	-163.33	220.06	-0.742	0.460469	
IDXI	-1362.94	220.06	-6.194	3.72e-08	***
IDXII	98.57	220.06	0.448	0.655604	
IDXIII	-793.68	220.06	-3.607	0.000582	***
IDXIV	96.28	220.06	0.438	0.663084	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 381.2 on 69 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.7947, Adjusted R-squared: 0.7531
F-statistic: 19.08 on 14 and 69 DF, p-value: < 2.2e-16

Test de Normalidad de Shapiro-Wilk

W = 0.9899, p-value = 0.7632

Tabla de Análisis de Variancia

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
TRAT	1	5503214	5503214	37.881	4.354e-08	***
ID	13	33310683	2562360	17.638	< 2.2e-16	***
Residuals	69	10024108	145277			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 3: Estadística en la Comparación de tres métodos para la determinación del Cbio y su relación con otros parámetros del suelo

Correlación

	BMS	BMW	BMI	AO	L	ARC	PH	Ndisp	LnNdisp	CT
BMS	1.00	-0.06	0.02	0.29	-0.28	-0.20	-0.21	-0.05	-0.03	0.36
BMW	-0.06	1.00	0.07	0.01	-0.04	0.03	0.15	0.08	0.06	0.18
BMI	0.02	0.07	1.00	0.03	-0.05	0.02	0.40	-0.10	-0.16	0.37
AO	0.29	0.01	0.03	1.00	-0.90	-0.76	-0.15	-0.08	-0.10	0.33
L	-0.28	-0.04	-0.05	-0.90	1.00	0.39	0.25	0.15	0.17	-0.30
ARC	-0.20	0.03	0.02	-0.76	0.39	1.00	-0.07	-0.06	-0.04	-0.24
PH	-0.21	0.15	0.40	-0.15	0.25	-0.07	1.00	0.28	0.24	0.36
Ndisp	-0.05	0.08	-0.10	-0.08	0.15	-0.06	0.28	1.00	0.99	-0.03
LnNdisp	-0.03	0.06	-0.16	-0.10	0.17	-0.04	0.24	0.99	1.00	-0.07
CT	0.36	0.18	0.37	0.33	-0.30	-0.24	0.36	-0.03	-0.07	1.00
TN	0.24	0.22	0.46	0.24	-0.22	-0.17	0.44	-0.05	-0.10	0.96
CN	0.29	-0.19	-0.39	0.31	-0.30	-0.21	-0.57	-0.03	0.02	-0.25
COT	0.38	0.19	0.29	0.34	-0.32	-0.23	0.15	-0.10	-0.12	0.91
STOCK	0.29	0.07	-0.11	0.11	-0.01	-0.21	0.08	0.14	0.16	0.45
COT.N	0.26	-0.14	-0.41	0.32	-0.32	-0.19	-0.70	-0.10	-0.04	-0.32
P	-0.07	-0.08	-0.05	0.10	-0.16	0.03	-0.14	-0.06	-0.09	0.04
LnP	-0.07	0.04	-0.19	-0.06	-0.02	0.14	-0.26	0.14	0.15	-0.28
CIC	0.01	0.13	0.31	-0.12	0.14	0.05	0.63	0.32	0.30	0.61
	TN	CN	COT	STOCK	COT.N	P	LnP	CIC		
BMS	0.24	0.29	0.38	0.29	0.26	-0.07	-0.07	0.01		
BMW	0.22	-0.19	0.19	0.07	-0.14	-0.08	0.04	0.13		
BMI	0.46	-0.39	0.29	-0.11	-0.41	-0.05	-0.19	0.31		
AO	0.24	0.31	0.34	0.11	0.32	0.10	-0.06	-0.12		
L	-0.22	-0.30	-0.32	-0.01	-0.32	-0.16	-0.02	0.14		
ARC	-0.17	-0.21	-0.23	-0.21	-0.19	0.03	0.14	0.05		
PH	0.44	-0.57	0.15	0.08	-0.70	-0.14	-0.26	0.63		
Ndisp	-0.05	-0.03	-0.10	0.14	-0.10	-0.06	0.14	0.32		
LnNdisp	-0.10	0.02	-0.12	0.16	-0.04	-0.09	0.15	0.30		
CT	0.96	-0.25	0.91	0.45	-0.32	0.04	-0.28	0.61		
TN	1.00	-0.49	0.87	0.41	-0.51	0.06	-0.29	0.67		
CN	-0.49	1.00	-0.19	-0.13	0.91	-0.09	0.11	-0.55		
COT	0.87	-0.19	1.00	0.60	-0.11	0.13	-0.13	0.49		
STOCK	0.41	-0.13	0.60	1.00	0.00	0.15	0.01	0.42		
COT.N	-0.51	0.91	-0.11	0.00	1.00	-0.02	0.22	-0.60		
P	0.06	-0.09	0.13	0.15	-0.02	1.00	0.63	-0.02		
LnP	-0.29	0.11	-0.13	0.01	0.22	0.63	1.00	-0.18		
CIC	0.67	-0.55	0.49	0.42	-0.60	-0.02	-0.18	1.00		

p-value

	BMS	BMW	BMI	AO	L
BMS	1.0000000000	0.59812441	8.336594e-01	8.673309e-03	0.0129326799
BMW	0.5981244063	1.00000000	5.339823e-01	9.114316e-01	0.7314956828
BMI	0.8336593814	0.53398231	1.000000e+00	7.910632e-01	0.6350180651
AO	0.0086733086	0.91143158	7.910632e-01	1.000000e+00	0.0000000000
L	0.0129326799	0.73149568	6.350181e-01	0.000000e+00	1.0000000000
ARC	0.0769838663	0.78448563	8.829085e-01	4.440892e-16	0.0003432003
PH	0.0685241092	0.18632069	2.435428e-04	1.971682e-01	0.0253350620
Ndisp	0.6744343334	0.49950597	3.828134e-01	4.897644e-01	0.1818715507
LnNdisp	0.8054137100	0.58508869	1.547280e-01	3.735132e-01	0.1281032626
CT	0.0011435338	0.10592091	6.616988e-04	2.722712e-03	0.0064499103
TN	0.0328754449	0.05639334	2.333046e-05	3.425727e-02	0.0502019452
CN	0.0097559912	0.08682468	4.441716e-04	5.258369e-03	0.0074343492

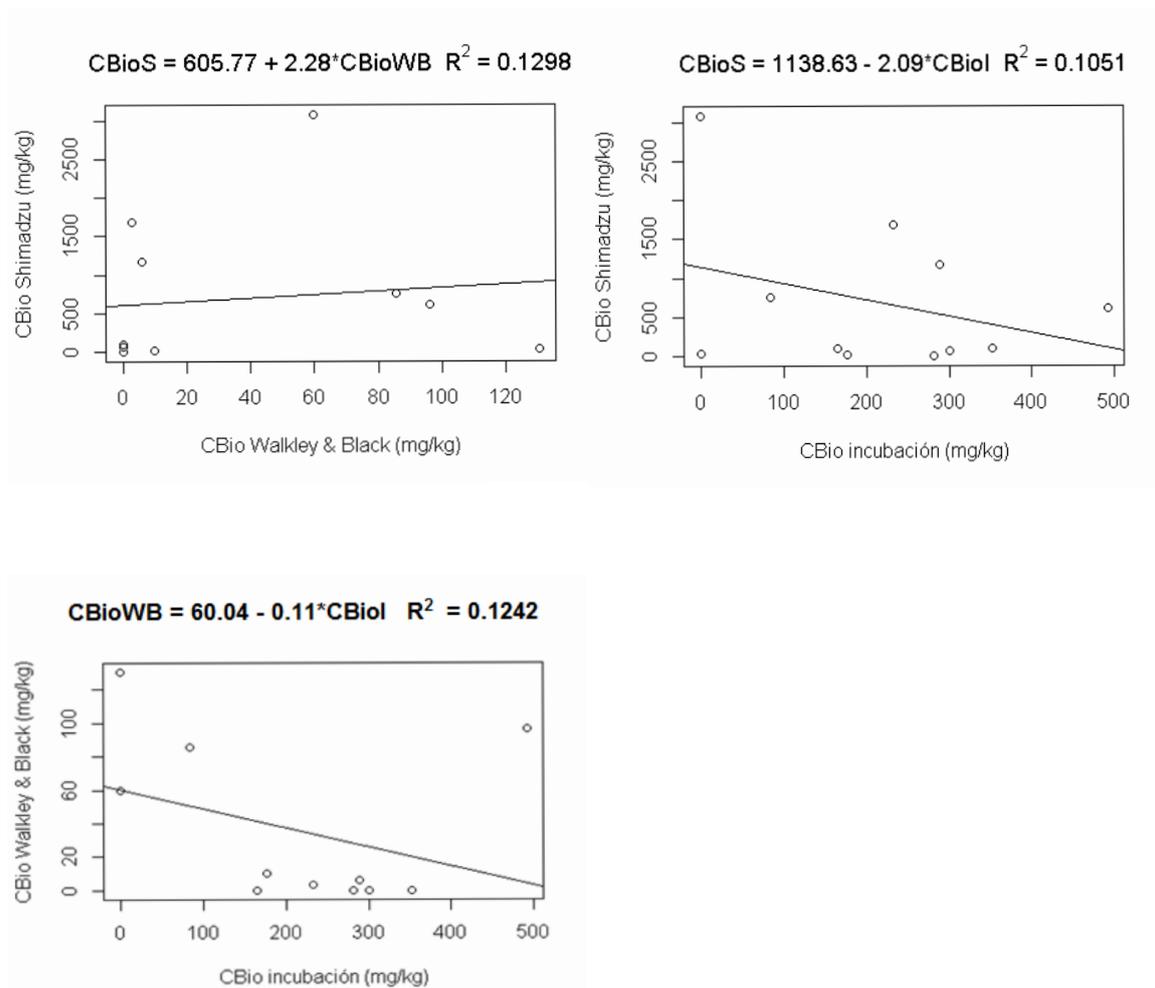
COT	0.0004982958	0.08985061	9.655976e-03	2.227502e-03	0.0036025663
STOCK	0.0100377992	0.51297697	3.277783e-01	3.289857e-01	0.9017355819
COT.N	0.0184441914	0.21753577	1.877011e-04	3.842602e-03	0.0037118447
P	0.5675347448	0.49909074	6.551474e-01	3.864519e-01	0.1589302079
LnP	0.5343427660	0.70853050	9.692784e-02	6.294972e-01	0.8865838798
CIC	0.9331080375	0.26017225	5.264764e-03	2.860734e-01	0.2255361726
	ARC	PH	Ndisp	LnNdisp	CT
BMS	7.698387e-02	6.852411e-02	0.67443433	0.80541371	1.143534e-03
BMW	7.844856e-01	1.863207e-01	0.49950597	0.58508869	1.059209e-01
BMI	8.829085e-01	2.435428e-04	0.38281337	0.15472798	6.616988e-04
AO	4.440892e-16	1.971682e-01	0.48976438	0.37351316	2.722712e-03
L	3.432003e-04	2.533506e-02	0.18187155	0.12810326	6.449910e-03
ARC	1.000000e+00	5.677681e-01	0.60326463	0.70619926	2.983222e-02
PH	5.677681e-01	1.000000e+00	0.01137748	0.03538584	1.263945e-03
Ndisp	6.032646e-01	1.137748e-02	1.00000000	0.00000000	8.252929e-01
LnNdisp	7.061993e-01	3.538584e-02	0.00000000	1.00000000	5.560204e-01
CT	2.983222e-02	1.263945e-03	0.82529294	0.55602035	1.000000e+00
TN	1.330165e-01	4.476814e-05	0.66649819	0.38629034	0.000000e+00
CN	6.751974e-02	5.499616e-08	0.82597254	0.87475328	2.369717e-02
COT	4.267243e-02	1.950134e-01	0.40314890	0.28734275	0.000000e+00
STOCK	6.263104e-02	4.591034e-01	0.22225380	0.15734902	3.390499e-05
COT.N	8.723455e-02	7.989165e-13	0.40114177	0.72001541	4.112661e-03
P	7.922839e-01	2.069229e-01	0.62504194	0.43322826	7.467912e-01
LnP	2.233765e-01	1.894495e-02	0.20464419	0.19990203	1.218227e-02
CIC	6.636538e-01	3.900167e-10	0.00398765	0.00794656	2.397091e-09
	TN	CN	COT	STOCK	COT.N
BMS	3.287544e-02	9.755991e-03	4.982958e-04	1.003780e-02	1.844419e-02
BMW	5.639334e-02	8.682468e-02	8.985061e-02	5.129770e-01	2.175358e-01
BMI	2.333046e-05	4.441716e-04	9.655976e-03	3.277783e-01	1.877011e-04
AO	3.425727e-02	5.258369e-03	2.227502e-03	3.289857e-01	3.842602e-03
L	5.020195e-02	7.434349e-03	3.602566e-03	9.017356e-01	3.711845e-03
ARC	1.330165e-01	6.751974e-02	4.267243e-02	6.263104e-02	8.723455e-02
PH	4.476814e-05	5.499616e-08	1.950134e-01	4.591034e-01	7.989165e-13
Ndisp	6.664982e-01	8.259725e-01	4.031489e-01	2.222538e-01	4.011418e-01
LnNdisp	3.862903e-01	8.747533e-01	2.873427e-01	1.573490e-01	7.200154e-01
CT	0.000000e+00	2.369717e-02	0.000000e+00	3.390499e-05	4.112661e-03
TN	1.000000e+00	4.734782e-06	0.000000e+00	1.896474e-04	1.441773e-06
CN	4.734782e-06	1.000000e+00	1.017240e-01	2.691475e-01	0.000000e+00
COT	0.000000e+00	1.017240e-01	1.000000e+00	3.985513e-09	3.481588e-01
STOCK	1.896474e-04	2.691475e-01	3.985513e-09	1.000000e+00	9.909845e-01
COT.N	1.441773e-06	0.000000e+00	3.481588e-01	9.909845e-01	1.000000e+00
P	5.694743e-01	4.108358e-01	2.588034e-01	1.732110e-01	8.400598e-01
LnP	8.516950e-03	3.167620e-01	2.389704e-01	9.426981e-01	4.738120e-02
CIC	1.721068e-11	1.893457e-07	4.628776e-06	1.020264e-04	4.551175e-09
	P	LnP	CIC		
BMS	5.675347e-01	5.343428e-01	9.331080e-01		
BMW	4.990907e-01	7.085305e-01	2.601722e-01		
BMI	6.551474e-01	9.692784e-02	5.264764e-03		
AO	3.864519e-01	6.294972e-01	2.860734e-01		
L	1.589302e-01	8.865839e-01	2.255362e-01		
ARC	7.922839e-01	2.233765e-01	6.636538e-01		
PH	2.069229e-01	1.894495e-02	3.900167e-10		
Ndisp	6.250419e-01	2.046442e-01	3.987650e-03		
LnNdisp	4.332283e-01	1.999020e-01	7.946560e-03		
CT	7.467912e-01	1.218227e-02	2.397091e-09		
TN	5.694743e-01	8.516950e-03	1.721068e-11		
CN	4.108358e-01	3.167620e-01	1.893457e-07		
COT	2.588034e-01	2.389704e-01	4.628776e-06		
STOCK	1.732110e-01	9.426981e-01	1.020264e-04		

COT.N	8.400598e-01	4.738120e-02	4.551175e-09
P	1.000000e+00	5.140612e-10	8.317214e-01
LnP	5.140612e-10	1.000000e+00	1.104647e-01
CIC	8.317214e-01	1.104647e-01	1.000000e+00

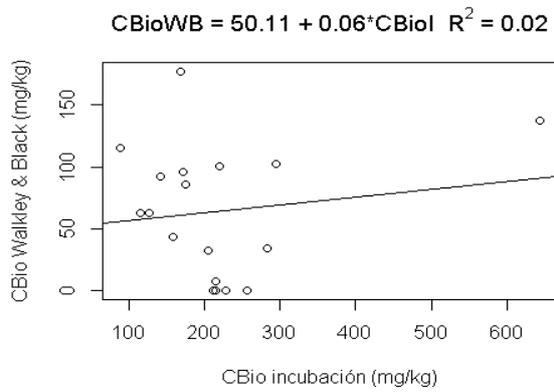
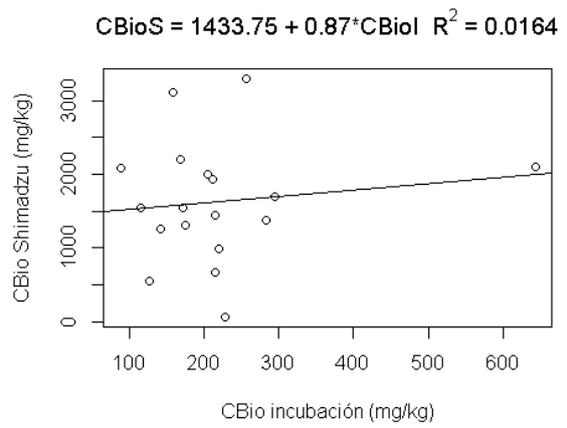
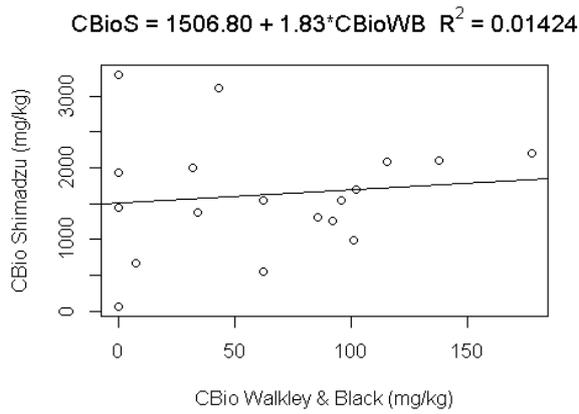
Gráficos de modelos

CBio determinado por tres métodos en suelos de diferentes UAT.

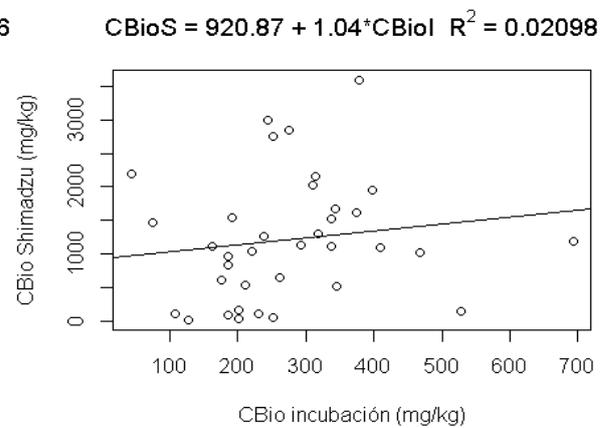
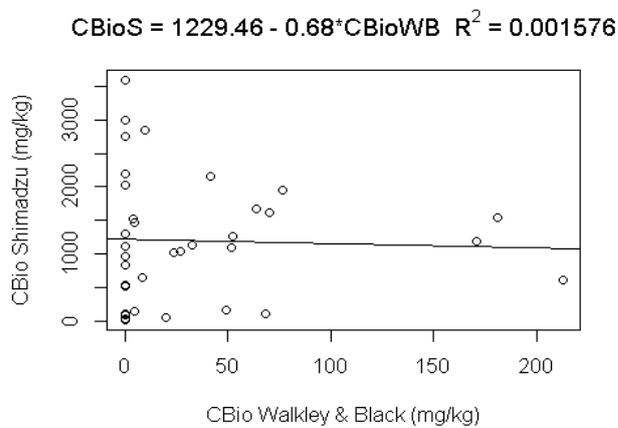
UAT:Descanso



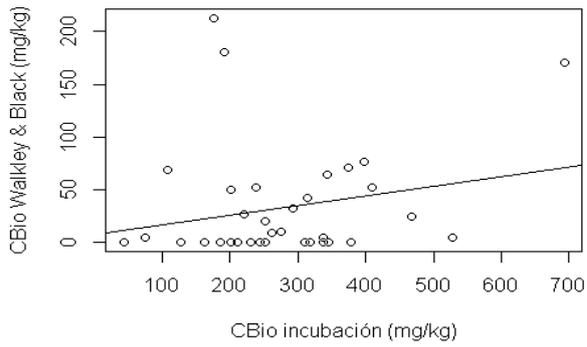
UAT:Maca



UAT:Pasto

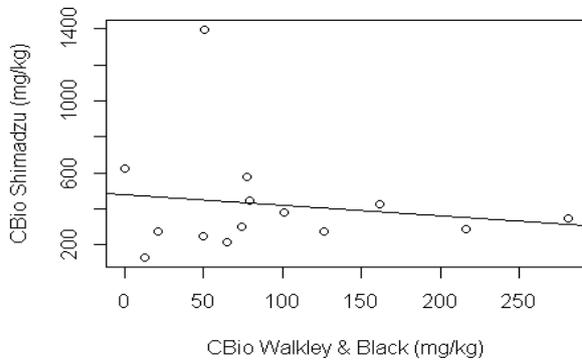


$CBioWB = 7.61 + 0.09 \cdot CBioI \quad R^2 = 0.04695$

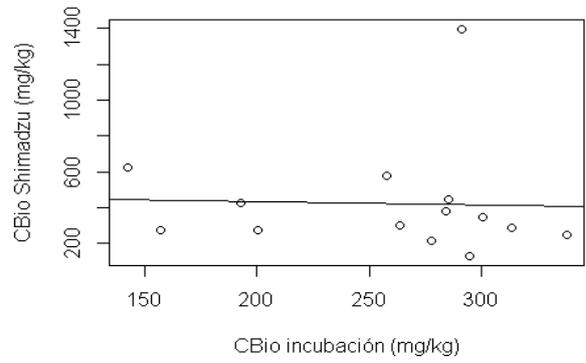


UAT:Pastura

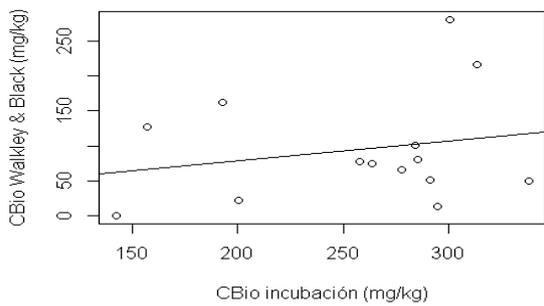
$CBioS = 480.10 - 0.59 \cdot CBioWB \quad R^2 = 0.02278$



$CBioS = 468.76 - 0.17 \cdot CBioI \quad R^2 = 0.001107$

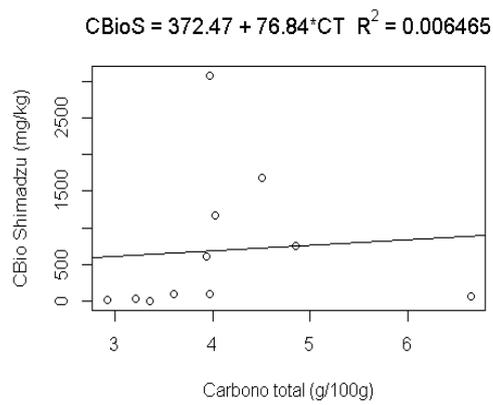
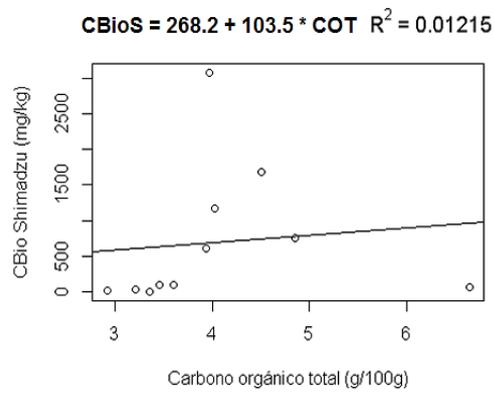


$CBioWB = 21.02 + 0.28 \cdot CBioI \quad R^2 = 0.04624$

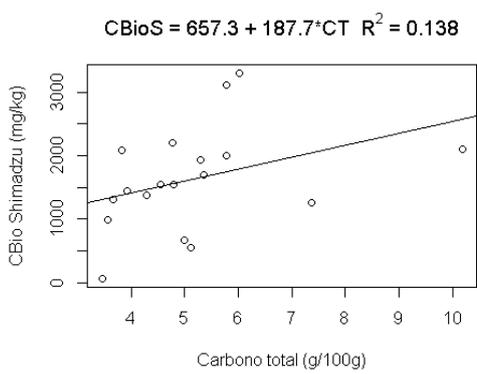
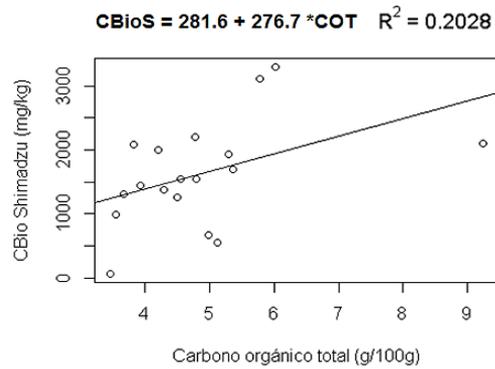


Correlaciones con el Carbono Total (CT) y el Carbono Orgánico Total (COT)

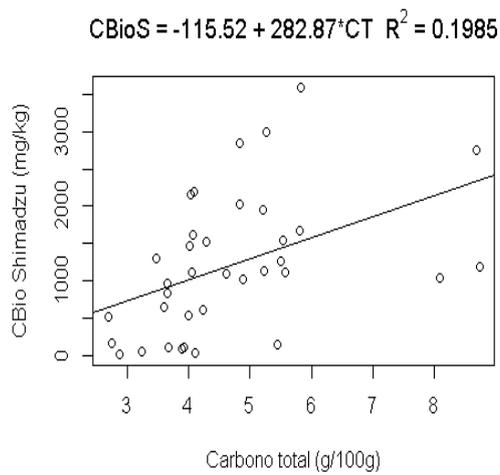
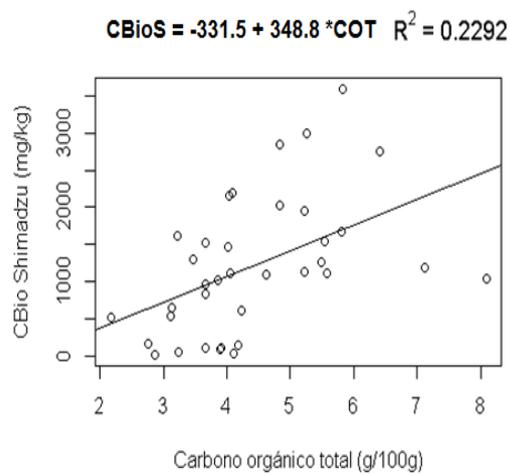
UAT:Descanso



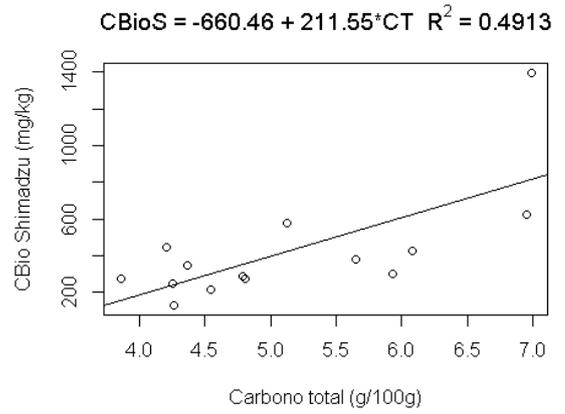
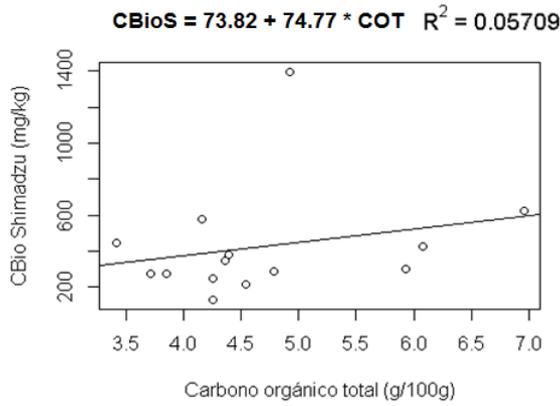
UAT:Maca



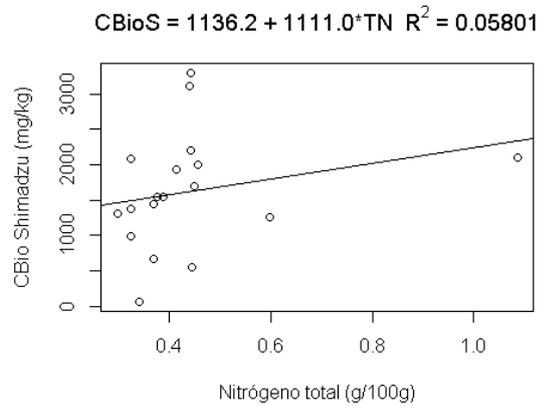
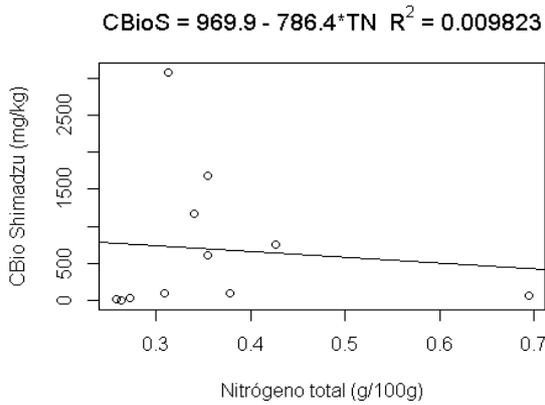
UAT:Pasto



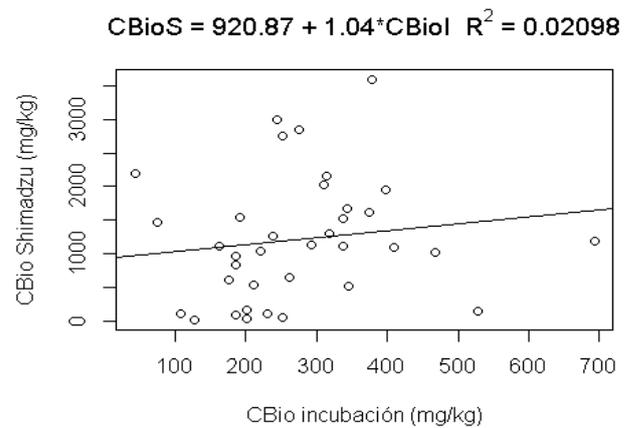
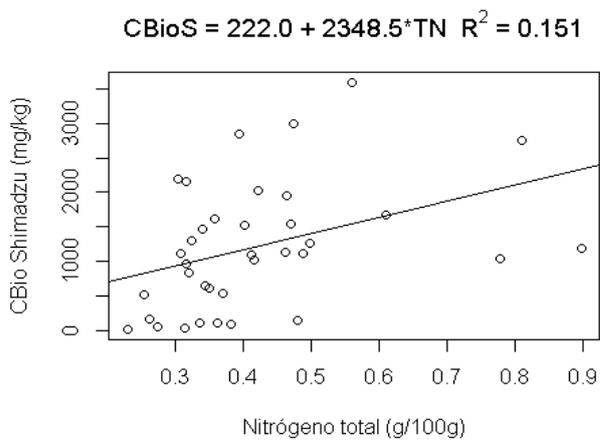
UAT:Pastura



Correlaciones con el Nitrógeno Total (NT)



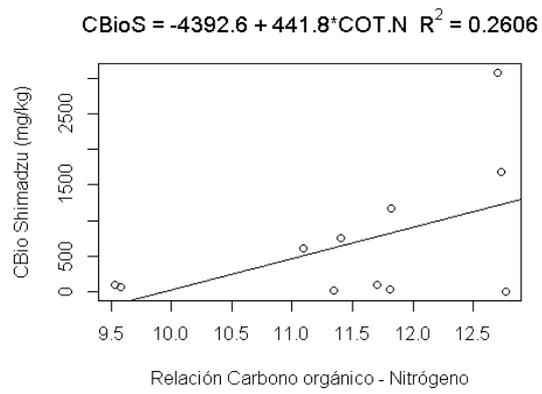
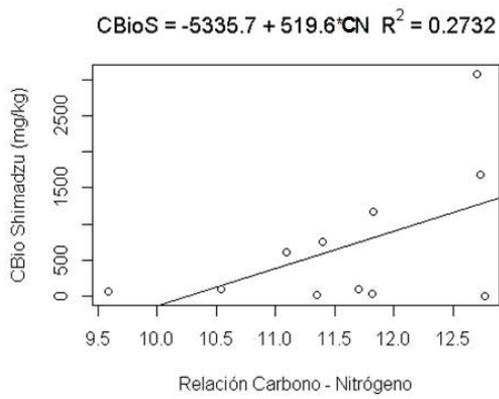
Lado izquierdo descanso, lado derecho maca.



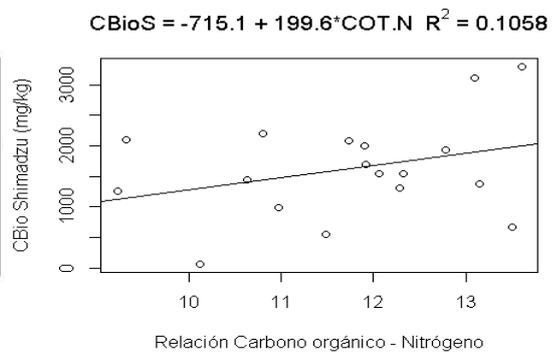
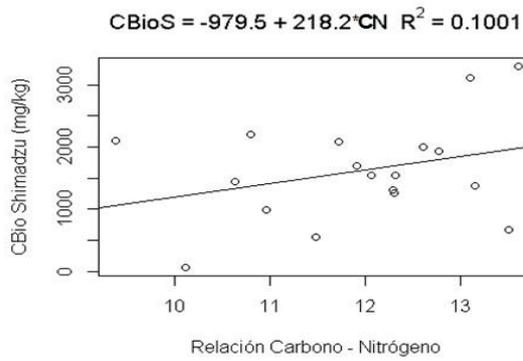
Lado izquierdo pasto, lado derecho pastura.

Correlaciones con la relación C:N y COT:N

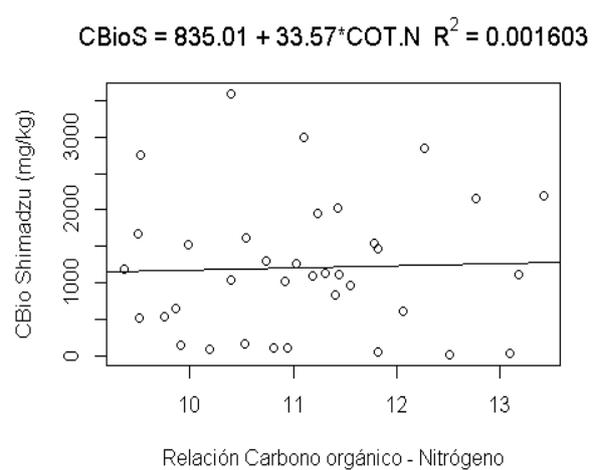
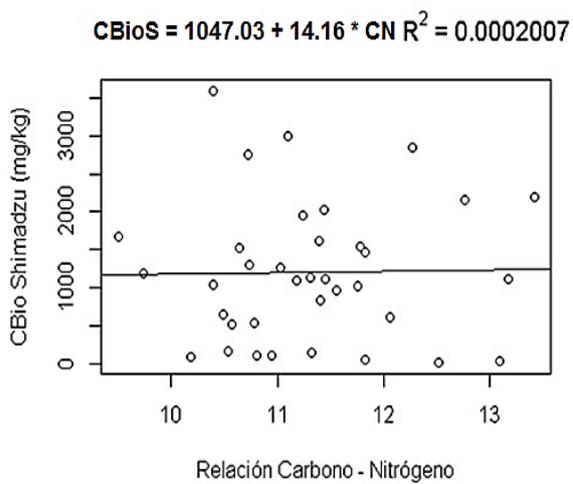
Descanso



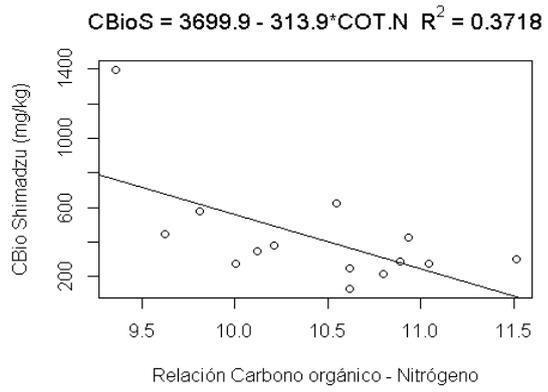
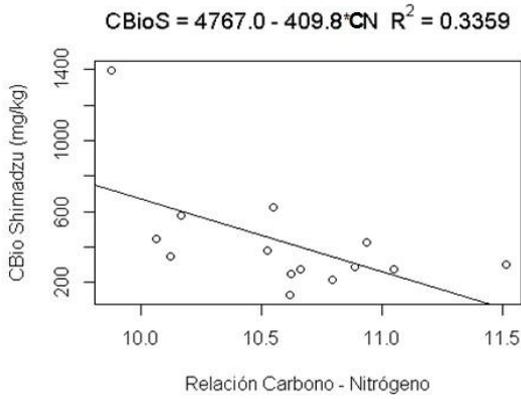
Maca



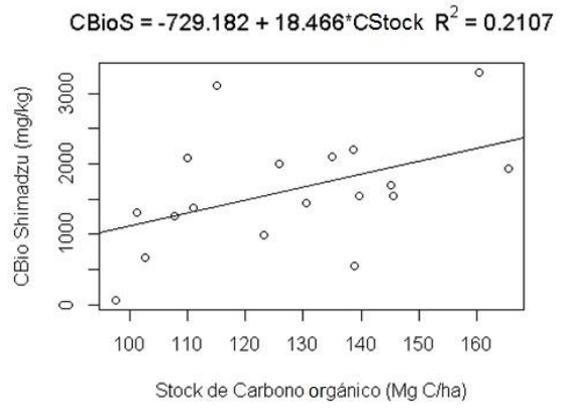
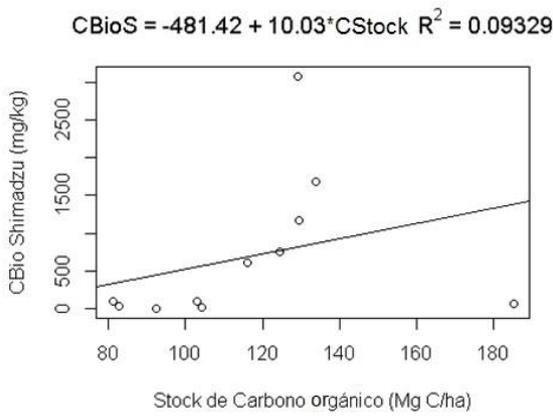
Pasto



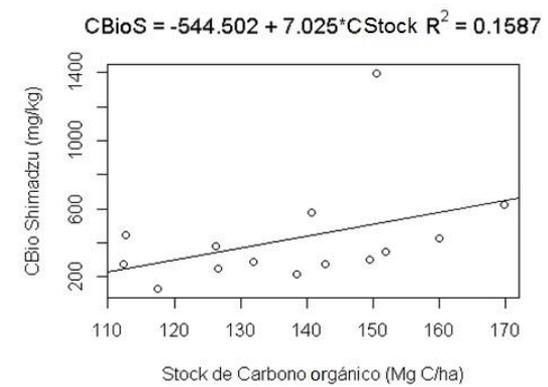
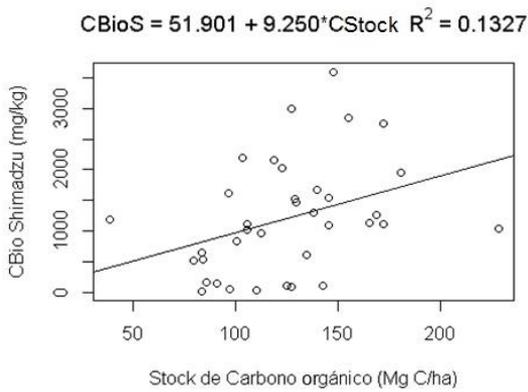
Pastura



Correlaciones con el Stock de Carbono (CStock)

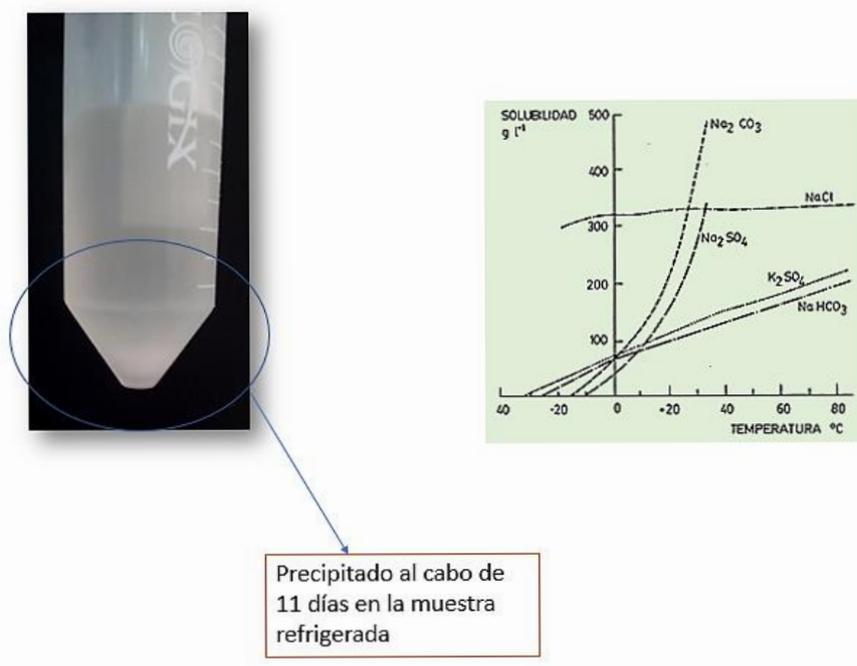


Lado izquierdo Descanso, lado derecho Maca



Lado izquierdo Pasto, lado derecho Pastura

Anexo 4: Precipitado formado en el extracto por la baja solubilidad del K_2SO_4



Anexo 5: Origen de muestras

En el Efecto de la refrigeración de extractos por 11 días

Muestra	Procedencia	Poblado	Profundidad (cm)
M1		Manzanayoc	0-25
M2		Manzanayoc	26-37
M3		Manzanayoc	38
M4		Pararani	0-35
M5	Dpto: Ayacucho	Pararani	36-46
M6	Provincia: Parinacochas	Influencia Tampa	0-35
M7	Distrito: Pullo	Influencia Tampa	36-52
M8		Chinqueni	0-33
M9		Chinqueni	34-56
M10		Antallana Pullo	0-33
M11		Antallana Pullo	34-60
Especie vegetal asociada			
M12	Dpto: Junín	Plantación de teca	0-20
M13	Provincia: Chanchamayo	Sistema de café	0-20
M14	Distrito: San Ramón	Plantación de oje	0-20

En la comparación de tres métodos de cuantificación del Cbio

Código de Identificación	Locación	UAT	Años de UAT	Uso de maca	Uso Previo	Años de uso previo
1	Este de Junín	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
2.1	Este de Junín	Descanso	11	Descanso	Maca	1
2.2	Este de Junín	Descanso	11	Descanso	Maca	1
3.1	Este de Junín	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
3.2	Este de Junín	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
3.3	Este de Junín	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
4	Callahuay	Maca	3	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
5	Callahuay	Descanso	8	Descanso	Maca	2
6	Callahuay	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
7	Callahuay	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
8	Coricocha	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
9	Coricocha	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
10	Coricocha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
11	Coricocha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
12	Coricocha	Descanso	8	Descanso	Maca	3
13	Coricocha	Descanso	9	Descanso	Maca	1

14.1	Coricocha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
14.2	Coricocha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
15	Coricocha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
16	Este de Junín	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
17	Este de Junín	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
18	Este de Junín	Descanso	8	Descanso	Maca	1
19	Este de Junín	Descanso	8	Descanso	Maca	1
20	Este de Junín	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
21	Este de Junín	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
22	Viscahuain	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
23	Viscahuain	Maca	2	Maca 2	Descanso	3
24	Viscahuain	Descanso	7	Descanso	Maca	2
25	Viscahuain	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
26	Ramancancha	Maca	1	Maca 1	Pasto nativo	Indefinido
27	Ramancancha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
28	Ramancancha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
29	Ramancancha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido

30	Ramancancha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
32	Huayre	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
33	Huayre	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
34	Huayre	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
35	Villa Junin	Descanso	12	Descanso	Maca	1
37	Casacancha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
39	Chacacancha	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido
40	Chacacancha	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
43	Antacanchan	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
51	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
52	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
53	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
54	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
55	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
56	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
57	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido

58	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
59	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
60	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
61	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
62	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
63	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
64	Casaracra	Pastura	40	Pastura	Pasto nativo	Indefinido
65	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
67	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
68	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
69	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
70	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
71	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
72	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
73	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido

74	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
75	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
76	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
77	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
78	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
79	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
80	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
81	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
82	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
83	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
84	Casaracra	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
85	Vischahuain	Maca	1	Maca1	Descanso	8
86	Ondores	Descanso	9	Descanso	Maca	9?
87	Ondores	Pasto nativo	Indefinido	Pasto nativo	Pasto nativo	Indefinido
88	Ondores	Maca	2	Maca 2	Pasto nativo	Indefinido