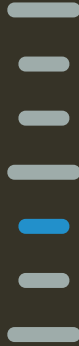




5

Métodos de estudio de los efectos de los incendios forestales en las propiedades bioquímicas y microbiológicas del suelo



5.1

Determinación de propiedades bioquímicas y microbiológicas de suelos quemados

Montserrat Díaz-Raviña¹, María Teresa Fontúrbel², César Guerrero³, Ángela Martín¹ y Tarsy Carballas¹

¹Departamento de Bioquímica del Suelo, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC), Apdo. 122, 15780, Santiago de Compostela. mdiazr@iiag.csic.es

²Departamento de Protección Forestal, Centro de Investigación Forestal de Lourizán, Carretera de Marín km 4, Pontevedra, Apdo. 127.

³Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad s/n, 0320 Elche, Alicante.

Determinación de propiedades bioquímicas y microbiológicas de suelos quemados

Montserrat Díaz-Raviña¹, María Teresa Fontúrbel², César Guerrero³, Ángela Martín¹ y Tarsy Carballas¹

¹ Departamento de Bioquímica del Suelo, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC), Apartado 122, 15780 Santiago de Compostela. mdiazr@iiag.csic.es

² Departamento de Protección Forestal, Centro de Investigación Forestal de Lourizán, Carretera de Marín km 4, Pontevedra, Apartado 127.

³ Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad s/n, 0320 Elche, Alicante.

RESUMEN

La medida de propiedades químicas y microbiológicas tales como la biomasa microbiana, la mineralización del N, la respiración del suelo, la determinación del adenosín-5'-trifosfato (ATP), las actividades enzimáticas generales o específicas de los ciclos de nutrientes y la estructura de la comunidad microbiana, está adquiriendo mucha importancia en los estudios de la Ciencia del Suelo. Sin embargo, a pesar de su interés y de que se sabe que la microbiota edáfica es la principal responsable de las funciones que se realizan en los suelos, la medida de todas estas propiedades, que proporciona información sobre distintos aspectos de los microorganismos y permite conocer la actividad metabólica del suelo y, por tanto, sirve de gran ayuda para entender la funcionalidad del mismo, todavía no se incluye de forma rutinaria en la caracterización tanto de suelos naturales como de suelos perturbados. En este capítulo se hace una revisión de las técnicas más empleadas para la determinación de estas propiedades bioquímicas y microbiológicas, haciendo especial hincapié en su aplicación a suelos quemados. El objetivo que se persigue es disponer de un documento de ayuda para todos aquellos investigadores que estén interesados en iniciarse en este campo de la ecología microbiana del ecosistema edáfico.

INTRODUCCIÓN

La microbiota edáfica está constituida por todos los organismos vivos menores de $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ que habitan un suelo. Incluye, por tanto, bacterias, actinobacterias, hongos, algas, protozoos y microfauna; algunos autores incluyen también a los virus. Estos microorganismos son responsables de la fertilidad del suelo al desempeñar una función muy importante en su hábitat natural dado que, por una parte, llevan a cabo un gran número de transformaciones en las más diversas condiciones ambientales interviniendo en los ciclos del C y los nutrientes, la meteorización de rocas y minerales del suelo, o las reacciones de complejación. Y, por otra, influyen en ciertas propiedades del suelo tales como estructura, temperatura, composición de la atmósfera, pH y potencial redox. En lo que respecta a los ciclos del C y los nutrientes, los modelos de las transformaciones que sufren el C, N y P en el medio edáfico demostraron que la biomasa microbiana es la vía y fuente de nutrientes que controla la dinámica del sistema. Los trabajos de numerosos autores han mostrado que la microbiota edáfica, aunque sólo representa un pequeño porcentaje de la materia orgánica del suelo (entre el 1-3 % del C orgánico), debido al poco tiempo que tarda en

reciclarse, tiene un papel como vía y fuente de nutrientes minerales para las plantas mucho más importante de lo que en principio se creía. Por otra parte, la microbiota edáfica también puede utilizarse como un bioindicador o indicador temprano de los cambios producidos en la calidad del suelo como consecuencia de procesos de degradación y/o prácticas de conservación del suelo mucho antes de que tales cambios se detecten mediante análisis de las propiedades físicas, físico-químicas y químicas del suelo (Pankhurst et al., 1998). La distribución y la densidad de la población microbiana viene determinada por un conjunto de factores bióticos y abióticos tales como pH, humedad, disponibilidad de nutrientes, o las relaciones inter e intraespecíficas con otros organismos. Así, ya que los microorganismos reflejan las condiciones del medio, cuando el ecosistema es alterado, de forma natural o debido a la acción del fuego, la comunidad microbiana, por su elevada tasa de renovación reaccionará rápidamente adaptándose a las nuevas condiciones del medio; algunos microorganismos morirán mientras que otros sobrevivirán y proliferarán ocupando nuevos nichos. Como resultado final observaremos cambios en la estructura (composición cuantitativa y cualitativa) de la población microbiana; por tanto, ésta puede ser utilizada como un marcador ecológico, es decir, como un parámetro indicador temprano de los cambios producidos en la calidad del suelo debido al impacto directo (muerte de microorganismos por temperaturas elevadas), o indirecto del incendio (cambios en las propiedades del suelo).

Muchas de las actividades que realizan los microorganismos son de gran interés por su repercusión en el crecimiento y nutrición de las plantas: i) liberación de nutrientes a partir de compuestos inorgánicos (solubilización); ii) de la materia orgánica (mineralización); iii) aporte de metabolitos que son utilizados como nutrientes por las plantas; iv) intervención en reacciones de oxidación que conducen a los iones a sus formas solubles asimilables; o v) competición con la planta por nutrientes o inmovilización. Es de interés, asimismo, su papel en la humificación de la materia orgánica, proceso fundamental en la preservación de la fertilidad del suelo. Tenemos pues, que los microorganismos influyen en el crecimiento y desarrollo de la planta: mejora de la absorción de nutrientes, alteración de la morfología y la capacidad de absorción de la raíz, modificación de las condiciones del medio edáfico, competencia con la planta o producción de sustancias que actúan como hormonas análogas, aunque su repercusión e incidencia va a depender, en gran medida, de su forma de vida, libre o en simbiosis. Además, independientemente de su forma de vida, la actividad microbiana influye indirectamente en el desarrollo de la planta al proporcionarle una estructura adecuada para su desarrollo ya sea por promover la formación de agregados mediante la secreción de polisacáridos, por afectar a la retención de agua por la acción también de los lipopolisacáridos, o por mejorar la textura del suelo mediante el efecto ligazón de las hifas de los hongos sobre las partículas del suelo.

Por lo tanto, los microorganismos que viven en el suelo tienen una enorme repercusión e incidencia en la fertilidad y calidad del suelo ya que, por un lado, intervienen en muchos procesos que ocurren en el medio edáfico y, por otro, una vez muertos ponen a disposición de otros microorganismos y de las plantas los nutrientes contenidos en sus metabolitos celulares. Actualmente se acepta que los microorganismos no sólo son los principales agentes responsables de la fertilidad del suelo sino que también lo son de la estabilidad y funcionamiento tanto de los ecosistemas naturales como de los sistemas agrícolas (Bardgett et al., 2005). El papel de los microorganismos en los suelos quemados es, si cabe, mucho mayor que en los suelos naturales dado

que tras el incendio, al desaparecer la vegetación, el suelo está desnudo y desprotegido, la estructura se degrada, y existe riesgo de erosión postincendio; así pues, tras el impacto directo e indirecto del fuego, y particularmente en incendios de severidad alta, los microorganismos son los únicos agentes que pueden modificar y mejorar las condiciones postincendio del suelo favoreciendo así la implantación de una cubierta vegetal, lo que, a su vez, resulta crucial para la restauración del ecosistema forestal que implica la recuperación del suelo y la regeneración de la vegetación. La importancia de los microorganismos en el desarrollo sostenible de los sistemas suelo-planta, juntamente con el hecho de que la microbiota edáfica es un recurso natural no renovable y un bioindicador de los cambios sufridos en la calidad del suelo, justifican la trascendencia del estudio de diversos aspectos de los microorganismos (densidad, masa, actividad y diversidad) en el contexto de los ecosistemas forestales quemados. Recientemente la microbiota de estos suelos ha sido objeto de estudio (Carballas et al., 2009; Mataix-Solera et al., 2009a; b) poniéndose de manifiesto que el conocimiento de la respuesta de la comunidad microbiana frente al estrés producido por el impacto de los incendios forestales, es decir, su susceptibilidad-resiliencia, resulta fundamental para entender el funcionamiento del ecosistema y, posteriormente, proceder a aplicar determinadas técnicas de recuperación del suelo.

El objetivo de este capítulo es exponer los procedimientos analíticos seguidos para la caracterización de las comunidades microbianas de suelos afectados por incendios forestales no controlados y quemas prescritas mediante análisis de determinadas propiedades bioquímicas y microbiológicas. Dado que este tipo de análisis es todavía poco habitual en la mayoría de los estudios realizados por los científicos españoles especialistas en la temática del efecto de los incendios sobre el medio edáfico y teniendo en cuenta, además, que su determinación presenta importantes diferencias con respecto a la estimación del resto de las propiedades del suelo, se describen brevemente todos los aspectos de su determinación comenzando por la recogida, preparación y conservación de las muestras, siguiendo por los principales métodos de determinación de propiedades bioquímicas y microbiológicas que proporcionan información sobre diversos aspectos de la comunidad microbiana tales como número, masa, actividad y estructura o diversidad y, finalmente, se aborda la problemática que puede plantear su determinación en suelos quemados. Una vez seleccionados los parámetros bioquímicos y microbiológicos que se quieren medir, así como los métodos de determinación más adecuados para ello, se recomienda consultar bibliografía metodológica específica para un análisis detallado del procedimiento analítico que hay que seguir (Wollum, 1982; Weaver et al., 1994; Alef y Nannipieri, 1995; García et al., 2003).

RECOGIDA DE MUESTRAS DEL SUELO

La recogida de muestras es fundamental a la hora de determinar las propiedades bioquímicas y microbiológicas del suelo. Las muestras deben ser representativas de la zona a muestrear, así pues, dado que la microbiota presenta una enorme variación natural espacial y temporal, la información de que se disponga “a priori” sobre la variación de los parámetros biológicos dentro del área a muestrear puede ser de gran ayuda a la hora de determinar el procedimiento a seguir. La variación espacial, que difiere dependiendo de la escala que se considere, se atribuye a facto-

res climáticos, vegetación, tipo de suelo y uso del mismo, topografía, efecto rizosférico, aplicación de productos fitosanitarios y a las prácticas de manejo, mientras que la variación temporal se atribuye fundamentalmente a factores climáticos, al aporte de restos vegetales y al efecto rizosférico, es decir, al efecto de las estaciones. La alta variación espacial exige la recogida de un elevado número de submuestras de suelo mientras que la variación temporal exige la recogida periódica de las muestras con el fin de determinar los niveles de referencia de los parámetros analizados. La estrategia del muestreo, que incluye la selección de la parcela experimental, del método y de la frecuencia del muestreo, viene determinada por el objetivo del experimento, aunque siempre se tiende a reducir el número de muestras a un nivel aceptable tanto a nivel científico como de reducción de los costes analíticos.

En general, dependiendo del objetivo del estudio a realizar y del diseño del experimento se puede optar por recoger una muestra única, representativa de toda el área de estudio, de aproximadamente 5-6 kg formada por múltiples submuestras de suelo recogidas de forma uniforme en distintas zonas a lo largo de toda la extensión de la parcela de estudio o bien por dividir el área de estudio en distintas parcelas experimentales (mínimo 3-5 parcelas experimentales) y recoger una muestra, formada a su vez por una mezcla de varias submuestras de suelo distribuidas de forma uniforme dentro de la misma parcela experimental, en cada una de las réplicas de campo de la zona de estudio. La elección del muestreo que conduce a la obtención de una muestra única de suelo no proporciona información de la variación espacial de la parcela de estudio pero, dado que la muestra es representativa de toda la parcela, los datos pueden compararse con los obtenidos en otros suelos o en el mismo suelo en otras épocas de muestreo; este tipo de recogida es aconsejable cuando se realizan ensayos de laboratorio y/o de invernadero donde se analiza el efecto de 1 o varios factores sobre la microbiota edáfica y también en los estudios de ecología microbiana, realizados bajo condiciones de campo, cuando se trabaja con muchos suelos diferentes y varias variables con el fin de poder relacionar las propiedades bioquímicas y microbiológicas con otras propiedades del medio edáfico mediante análisis multivariante. La elección del muestreo utilizando varias subparcelas experimentales dentro de la misma parcela al proporcionar información de la variación natural dentro del mismo suelo -variación espacial y variación temporal si los muestreos se repiten en el tiempo- es aconsejable cuando se realizan estudios de campo con muy pocos suelos y se estudia la influencia de uno o varios factores sobre una determinada propiedad analizada mediante análisis univariante.

Los efectos del fuego sobre las propiedades edáficas tienden a disminuir con la profundidad; así, en los estudios donde se evalúa el impacto del incendio sobre el suelo las muestras se suelen recoger en los 0-2,5 cm, 2,5-5 cm ó 0-5 cm superiores del suelo mineral, horizonte A, una vez descartada la capa de hojarasca y los restos vegetales carbonizados de mayor tamaño. La toma de muestras de suelo quemado ha de hacerse en las mismas condiciones que las del suelo control no quemado recogiendo, dependiendo del experimento, una muestra única o varias muestras dentro de la misma parcela experimental. A este respecto conviene señalar la dificultad que conlleva la recogida de las muestras dado que, con frecuencia, la zona afectada por el incendio forestal no controlado o por el fuego experimental, quema prescrita, no suele ser lo suficientemente homogénea para poder establecer las diferentes parcelas experimentales dado que en un espacio muy reducido se observan con frecuencia zonas afectadas con distinto grado de seve-

ridad, sobre la base de criterios visuales tales como la destrucción de hojarasca y/o la presencia de cenizas blancas o negras. Además, es necesario hacer hincapié que es muy difícil disponer de verdaderas réplicas dado que en la mayor parte de las áreas afectadas a escala de parcela las réplicas pueden presentar diferente topografía, suelo, vegetación o clima y, además, la propagación del fuego es un fenómeno estocástico; así pues, generalmente, no se utilizan verdaderas réplicas sino pseudoréplicas (LeDuc y Rothstein, 2007). Este problema es más acuciante todavía en algunas regiones como Galicia debido a la heterogeneidad de los diversos factores que determinan el incendio (como el suelo, la vegetación, la topografía, la intensidad del fuego o el viento) y así, incluso en un área muy reducida existe una variabilidad espacial muy alta en cuanto al impacto del incendio sobre el suelo. En este sentido, la experiencia de largos años en el estudio de los incendios forestales ha permitido concluir que las mejores formas de muestrear suelos quemados son: i) muestrear a lo largo de varios transectos paralelos de 5-10 m, mediante la recogida de varias submuestras en varios perfiles de suelo y mezclando estas submuestras para formar una muestra compuesta única representativa de un área quemada concreta; y ii) muestrear en varios cuadrados de muestreo de aproximadamente 15 × 15 cm a lo largo de toda la parcela o parcelas de estudio. El primer método de estudio es aconsejable para parcelas grandes cuando se quiere tomar una muestra única o para estudios de laboratorio e invernadero, mientras que el segundo se recomienda para estudios de campo realizados en parcelas pequeñas siendo también muy útil cuando se recoge, además del suelo, la hojarasca no destruida correspondiente a esa superficie de suelo.

En general la recogida de muestras para el análisis de las propiedades bioquímicas y de la mayoría de las propiedades microbiológicas se realiza de la misma forma que la de las propiedades químicas del suelo, excepto cuando el objetivo es el análisis de la determinación del número de microorganismos por recuento de viables en cuyo caso la recogida tiene que hacerse en condiciones de máxima asepsia con el fin de evitar la contaminación de las muestras. La recogida de muestras de suelos quemados, dado que el suelo está desnudo, desprotegido y cubierto de cenizas, debe hacerse de la forma más cuidadosa posible para tratar de alterar lo mínimo posible la parcela experimental y evitar que se produzca la pérdida tanto de las cenizas como del suelo. Una vez recogidas las muestras en bolsas herméticas o recipientes de vidrio tapados se procede a llevarlas al laboratorio, en condiciones que eviten su recalentamiento y desecación, y se almacenan a 4°C hasta su posterior manipulación.

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta cuando se realiza el muestreo de los suelos quemados en una zona determinada afectada por el fuego, además de la facilidad de acceso, la homogeneidad de la zona afectada –según criterios topográficos, edafológicos, botánicos y de afección por el fuego–, y la extensión de la misma, debe ser suficientemente amplia para establecer las parcelas experimentales necesarias, es la existencia de un control adecuado de suelo no quemado que sirva de referencia y permita determinar el impacto del incendio forestal no controlado. En los fuegos experimentales o prescritos no existe el problema de selección de un control adecuado ya que en ellos esa selección y la aleatorización de los tratamientos es previa a la realización de las quemas. La elección de un control no adecuado resulta crítica dado que va a determinar el umbral de referencia de las propiedades bioquímicas y microbiológicas analizadas a partir de los cuales puede considerarse que hay un efecto del incendio

sobre la microbiota edáfica, influencia positiva si el suelo quemado presenta valores mayores que el suelo control e influencia negativa si presenta valores menores que el suelo control. Aunque este comportamiento se hace extensivo al resto de las propiedades edáficas, en el caso de la microbiota existe, además, el problema añadido de la variación natural de las propiedades analizadas, variación inter e intra suelos.

Una de las mayores dificultades a la hora de utilizar las propiedades bioquímicas y microbiológicas como indicadores del impacto del incendio es separar el efecto de la variación natural espacial y temporal- del efecto directo e indirecto del incendio forestal o quema prescrita. Este problema se puede resolver determinando la variación natural de las propiedades analizadas en el suelo control no quemado, dado que sólo el impacto de determinados factores o procesos, quemado en nuestro caso, que produzca modificaciones en la microbiota edáfica mayores que la variación natural son de importancia (Domsch, 1984). Por otra parte, dada la naturaleza dinámica de los parámetros bioquímicos y microbiológicos analizados y con el fin de minimizar el impacto de la variación natural, se recomienda, siempre que sea posible, recoger las muestras en la época del año en el que el clima sea más estable y cuando no haya perturbaciones recientes en el suelo. Por ejemplo en la zona templado húmeda a finales de otoño después de la descomposición de los restos vegetales aportados o a principios de primavera antes del crecimiento de las plantas y cuando el suelo no esté congelado o demasiado húmedo y en las zonas áridas y semiáridas en alguno de los meses de verano, a mediados de julio es una buena época.

La época y frecuencia del muestreo vienen determinadas en primer lugar por el momento en que se produzca el incendio y, en segundo lugar, por el objetivo del estudio, es decir, si se pretende evaluar el impacto directo del fuego y/o la evolución de las propiedades edáficas tras el incendio. Para evaluar el impacto directo del fuego o efecto de las temperaturas elevadas sobre la población microbiana, que siempre es negativo y de mayor o menor magnitud dependiendo de la severidad del fuego, el muestreo debe realizarse lo antes posible y antes de que se produzcan las primeras lluvias. Con las primeras lluvias se inicia la etapa postincendio comenzando también a evaluarse la influencia indirecta del incendio dado que al modificarse el medio edáfico tras el incendio (propiedades físicas, químicas y biológicas, destrucción total o parcial de la vegetación) y al rehumectarse el suelo se producirá la rápida recolonización del suelo por parte de los microorganismos que sobrevivieron a las altas temperaturas y/o se adaptan bien a estas nuevas condiciones del medio edáfico utilizando para ello C lábil y los nutrientes liberados durante el incendio (muerte celular, combustión de la materia orgánica); sin embargo, este incremento del crecimiento y actividad de los microorganismos, que tiende a enmascarar e incluso anular el efecto directo inicial negativo, es transitorio y después de un tiempo, cuando la disponibilidad de sustrato disminuye, tiende a desaparecer.

Para estudiar la evolución de las propiedades bioquímicas y microbiológicas tras el impacto del fuego el muestreo debe realizarse periódicamente a distintos intervalos de tiempo y con una periodicidad bastante frecuente en las primeras etapas postincendio (por ejemplo 1, 3, 6 y 12 meses después del incendio) y luego realizando muestreos más espaciados en el tiempo (por ejemplo 1 muestreo anual). En la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que esa "explosión" de la población inducida a corto plazo por el fuego puede explicar los resultados aparentemente contradictorios y/o no esperados observados en algunos estudios donde

se examinan los efectos de los incendios no controlados, de las quemas prescritas y del calentamiento en laboratorio (Ahlgren y Ahlgren, 1965; Díaz-Raviña et al., 1996); asimismo también hay que considerar, sobre todo en los estudios a medio y largo plazo, que las condiciones postincendio (clima, erosión postincendio o regeneración de la cubierta vegetal) condicionan notablemente a respuesta de las comunidades microbianas frente al fuego. Esto juntamente con el hecho de que las propiedades bioquímicas y microbiológicas presentan una diferente sensibilidad para detectar los cambios inducidos por el fuego ponen de manifiesto que la respuesta de la población microbiana a las perturbaciones del medio es compleja, depende del tiempo transcurrido tras el impacto del fuego y no puede ser evaluada utilizando únicamente un parámetro microbiano. Este problema se puede resolver, en parte, aumentando el número de muestreos en el tiempo (impacto a corto, medio y largo plazo) y abordando el estudio de varias propiedades bioquímicas y microbiológicas que proporcionen información complementaria sobre varios aspectos de la microbiota (número, masa, actividad y diversidad) y permitan, por tanto, evaluar su respuesta global frente al fuego.

Dependiendo del tipo de estudio y del diseño experimental, será conveniente utilizar un determinado procedimiento estadístico para poder evaluar el impacto del incendio sobre la población microbiana. Si en el experimento se analiza de forma puntual el impacto del incendio transcurrido un tiempo determinado conviene disponer de varias parcelas experimentales y recoger varias submuestras en cada una de ellas de forma que permitan determinar si el impacto del incendio es mayor que la variación espacial de los parámetros analizados dentro de las parcelas analizadas (análisis univariante). Si en el experimento se analiza la evolución de las propiedades bioquímicas y microbiológicas tras el incendio en comparación con el suelo control no quemado, es decir, el efecto del incendio a distintos intervalos de tiempo se puede utilizar el mismo esquema con varias réplicas y analizar los efectos del incendio y tiempo conjuntamente (ANOVA2, ANOVA de medidas repetidas), o separadamente (t-Student, comparar para cada tiempo los valores del suelo no quemado y quemado). Si los datos no cumplen los requisitos previos para la realización de estos análisis estadísticos, para poder determinar el efecto del fuego se hace necesario proceder a la transformación de estos datos con el fin de normalizarlos y poder comparar los valores (por ejemplo utilizando logaritmos) o bien realizar pruebas no paramétricas. Sin embargo, en determinados casos estos métodos pueden resultar no adecuados dado que ya inicialmente, debido probablemente a las dificultades planteadas con el muestreo -en suelos con elevado contenido de materia orgánica pequeñas variaciones en el muestreo se traducen en diferencias que no se deben a variación estacional o temporal sino al procedimiento de muestreo- se observan variaciones de importancia entre muestras del suelo no quemado recogidas en distintos tiempos, lo cual puede distorsionar la interpretación de los resultados. Por tanto, para facilitar la interpretación de los datos, el impacto del fuego puede evaluarse normalizando los valores obtenidos para el suelo quemado a partir de las fluctuaciones observadas con el tiempo en el suelo control no quemado (media \pm SD); así para cada suelo y variable los valores pueden ser estandarizados $Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X})/SD$, donde X_{ij} es el valor para la muestra del suelo quemado i en la época de muestreo j , y \bar{x} y SD eran la media y la desviación típica, respectivamente para todas las correspondientes muestras del suelo no quemado y tras el fuego (Martín et al., 2009).

PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

La forma tradicional de preparación del suelo para análisis químico, consistente en secado al aire, tamizado y molienda, no se puede aplicar para las estimaciones de número, masa actividad y diversidad de los microorganismos del suelo (Jenkinson, 1988; Díaz-Raviña, 1990; Weaver et al., 1994). En general, se considera que para evitar que se produzcan variaciones en las propiedades medidas, éstas deberían de determinarse utilizando suelo húmedo y realizando las medidas lo más rápidamente posible después del muestreo, considerándose suelo fresco aquel que, o bien se analiza inmediatamente después de su recogida, o bien ha sido conservado a 4 °C durante unos 15 días como máximo (García et al., 2003). Sin embargo, en la bibliografía se observa con frecuencia que se utilizan suelos secos al aire, suelos congelados y posteriormente descongelados siguiendo diferentes procedimientos, y, aunque se sabe que estos procesos de almacenamiento afectan a las propiedades medidas, esto generalmente no se tiene en cuenta en la interpretación de los datos obtenidos, por ejemplo cuando se comparan los valores con los obtenidos en otros estudios donde las muestras han sido tratadas de forma diferente.

El **secado** de las muestras al aire afecta a la composición relativa de los distintos grupos microbianos y produce la muerte de muchos microorganismos originando, por tanto, una esterilización parcial del suelo; si luego, además, se ajusta la humedad de la muestra se acelera la cesión de nutrientes de la solución del suelo. Esto debe tenerse en cuenta cuando los métodos de determinación llevan implícita una incubación de las muestras del suelo. Además, en la incubación prolongada de muestras de suelo hay que tener en cuenta que, en todo momento, las muestras deben protegerse de la desecación. Así pues, dado que el secado de las muestras de suelo al aire no es aconsejable, se recomienda, siempre que sea posible, recoger las muestras cuando el suelo está “a tempero” dado que facilita enormemente la manipulación de las muestras y, además, produce menos alteraciones en las propiedades medidas. En el caso de que el secado de las muestras al aire sea necesario se recomienda hacerlo con cuidado y paulatinamente para evitar causar modificaciones drásticas en la población microbiana. Por ejemplo extendiendo el suelo en capa gruesa y removiendo de vez en cuando para evitar que la capa superficial de suelo se seque demasiado y se esterilice parcialmente el suelo. Hay que señalar, sin embargo, que en zonas áridas o semiáridas, debido probablemente a que el suelo suele estar bastante seco durante semanas o incluso meses y los microorganismos están adaptados a la sequía, el secado al aire de las muestras tiene un efecto menos drástico sobre las poblaciones microbianas que en zonas más húmedas (Zornoza et al., 2006, 2007) observándose incluso que la incubación de las muestras podría suponer mayores cambios que el secado al aire (Zornoza et al., 2009).

En cuanto al **tamizado**, se ha observado que aunque se realice a través de una malla gruesa puede afectar a las propiedades bioquímicas y microbiológicas; sin embargo, dado que es necesario tamizar para poder descartar la mesofauna, los restos del material vegetal y las gravas del suelo, poder comparar resultados obtenidos de la misma fracción de suelo y porque permite usar una muestra más pequeña sin perder representatividad, la polémica radica en el tamaño de malla a utilizar; así, mientras algunos autores, particularmente cuando analizan suelos de textura fina con elevado contenido de arcilla, usan una malla gruesa la mayoría tamizan a 2 mm. Siempre que sea posible se debe evitar recoger las muestras cuando el suelo tiene una humedad elevada dado

que requieren una manipulación excesiva que obligaría, además del secado al aire, a forzar el paso del suelo a través del tamiz provocando la destrucción de los agregados del suelo y la muerte de los microorganismos. La homogenización del suelo también se considera necesaria y debe hacerse muy concienzudamente dado que generalmente en muchas de las determinaciones analíticas se utilizan cantidades muy pequeñas de suelo (por ejemplo 1-3 gramos en los ensayos enzimáticos y en el análisis de la estructura de la comunidad mediante biomarcadores moleculares) que, lógicamente, deben ser representativas de la totalidad de la muestra.

Con respecto al **almacenamiento**, se sabe que produce cambios en el número y distribución de la microbiota edáfica y que, aunque tiende a disminuir la población microbiana, el porcentaje de microorganismos formadores de esporas (bacterias esporuladas, actinobacterias y hongos) aumenta. Se considera, por una parte, que el almacenamiento durante períodos largos debe evitarse y que, en el caso de que esto no fuera posible, el suelo debe mantenerse a 0 °C o a -15 °C y posteriormente someterlo a un período de preincubación antes de llevar a cabo las determinaciones de propiedades bioquímicas y microbiológicas y, por otra, que la temperatura adecuada para el almacenamiento durante períodos de tiempo cortos es de 4 °C. Conviene señalar, sin embargo, que el almacenamiento de las muestras de suelo afecta de forma distinta a las distintas propiedades bioquímicas y microbiológicas consideradas. Por ejemplo el almacenamiento durante varios meses a 2-4 °C no suele afectar las estimaciones de la biomasa microbiana y, sin embargo, suele modificar drásticamente los niveles de las actividades enzimáticas. Se aconseja en el caso de estas últimas el almacenamiento durante un tiempo muy corto dado que la actividad disminuye rápidamente con el tiempo; así pues, dependiendo, por una parte, de la propiedad analizada y, por otra, del método de determinación utilizado, podrá realizarse un tipo u otro de almacenamiento y optar por aquel que altere lo menos posible las medidas a realizar.

La toma y preparación de muestras estimulan la actividad microbiana porque: i) producen la muerte de algunos microorganismos por ruptura mecánica, ii) exponen al ataque microbiano sustratos antes inaccesibles, iii) provocan la descomposición de los fragmentos de las raíces; y iv) al cambiar el entorno de los microorganismos provocan cambios tanto en su distribución como en sus relaciones con otros grupos microbianos. Así pues, determinadas propiedades bioquímicas y microbiológicas pueden estimarse inmediatamente después de la preparación de muestras o bien después de una incubación previa a 25 °C que elimine los efectos del manejo y del tamizado de las mismas. Después de numerosos estudios al respecto, parece ser que si se quieren determinar las propiedades en unas condiciones similares a las del campo, no es aconsejable una incubación previa ya que disminuye considerablemente los valores de actividad, y que ésta sólo es necesaria si hay grandes cantidades de raíces, si el suelo se almacenó a temperaturas bajas durante mucho tiempo o si se secó al aire y posteriormente se ha humectado con el fin de reactivar la actividad microbiana.

En resumen, es mejor realizar las medidas de las propiedades bioquímicas y microbiológicas en muestras de suelo recogidas recientemente, pero en el caso de que el suelo deba ser almacenado y aunque no se pueden establecer normas generales para su conservación, sino que las condiciones deberán establecerse de manera individual para cada suelo y propiedad a analizar, el método más recomendado es el almacenamiento de los suelos a 4 °C durante un período de tiempo lo más corto posible. Una excepción a este comportamiento es el análisis de ácidos grasos de los fosfoli-

pidos dado que se ha demostrado que el congelado de las muestras de suelo es preferible al almacenamiento a 4 °C (Liu et al., 2009). En lo que respecta a la recogida de muestras, siempre que sea posible, se debería hacer cuando el suelo está “a tempero” con el fin de reducir al mínimo posible la manipulación de las muestras antes de proceder al análisis de sus propiedades bioquímicas y microbiológicas y, por consiguiente, evitar la modificación de dichas propiedades y poder así caracterizar la comunidad microbiana en condiciones similares a las del campo.

La **preparación y conservación de muestras** de suelos quemados se hace de forma similar a la de sus homólogos los suelos no quemados. En estos suelos hay que tener cuidado cuando se humecta los suelos dado que, en muchos casos, se produce hidrofobia tras el impacto del fuego. También conviene tener en cuenta que, debido a la destrucción de la materia orgánica del suelo y la modificación drástica de muchas de sus propiedades físicas, químicas y físico-químicas, las partículas del suelo están sueltas y tienden a apelmazarse, es decir, que el suelo ha perdido su estructura y, por tanto, no constituye un buen entorno para el desarrollo tanto de los microorganismos que viven en el suelo como de las plantas. Tal como se comentó con anterioridad, generalmente en la mayoría de los estudios se trabaja con la fracción menor de 2 mm; sin embargo, en determinadas ocasiones, para el análisis de determinadas propiedades (C y N mineralizables, cinéticas de mineralización del C y N) o cuando se realizan experimentos con suelos incubados en condiciones de laboratorio y/o en condiciones de invernadero (Basanta et al., 2002, 2003, 2004; Villar et al., 2004; Díaz-Raviña et al., 2006), se utiliza la fracción menor de 4 mm con el fin de disminuir las alteraciones debidas al tamizado y preparación de las muestras, facilitar la manipulación de las muestras y, además, evitar que se produzca anaerobiosis cuando se realizan incubaciones y/o experiencias de larga duración.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO

La importancia de los microorganismos en ambientes naturales deriva de su ubicuidad, diversidad y, sobre todo, de su gran espectro de actividades muchas de las cuales tienen considerable repercusión en la producción edáfica. La gran diversidad de especies de la microbiota edáfica permite utilizar la gran variedad de sustratos en las más diversas condiciones ambientales mientras que las estructuras de supervivencia (cistos o esporas, formas inactivas) permiten adaptarse a la baja disponibilidad de sustrato. En los últimos años, una vez constatado el papel de los microorganismos como principales agentes responsables de la fertilidad del suelo la microbiología ha experimentado un enorme desarrollo; sin embargo, en muchas ocasiones, los resultados no han sido satisfactorios debido a un error de planteamiento ya que se creía que a mayor densidad y actividad microbiana correspondería una mayor fertilidad del suelo. Hoy en día se sabe que cada suelo tiene unos niveles óptimos de densidad microbiana y que no siempre el número de microorganismos se relaciona con la actividad microbiana. Por tanto, el principio del que hablábamos antes “a mayor abundancia y actividad microbiana mayor fertilidad” no siempre es válido. Así, por ejemplo, en un ecosistema donde la fertilidad sea baja la inactividad de los microorganismos es ecológicamente beneficiosa para proteger y/o conservar

el suelo, una gran actividad llevaría a una pérdida de materia orgánica por un exceso de mineralización de la misma y, en definitiva, a un suelo degradado. Por el contrario, en un ecosistema donde la fertilidad potencial sea muy alta debido al continuo aporte de materia orgánica fresca se requiere una población muy activa para causar la rápida mineralización de la materia orgánica, una población poco activa produce una mineralización lenta lo que lleva consigo una acumulación de la materia orgánica y una lenta cesión de nutrientes que repercute negativamente sobre la fertilidad de los suelos. Todo esto pone de manifiesto que el objetivo no puede ser potenciar la actividad de los microorganismos para conseguir la máxima mineralización sino llevar esa mineralización a la velocidad óptima adecuada a las condiciones específicas de cada suelo, considerando como nivel óptimo aquel que proporciona los nutrientes requeridos para las plantas y, además, asegure la preservación de la fertilidad del suelo. Por tanto, para interpretar los resultados de los estudios microbiológicos es necesario estudiar los microorganismos desde un punto de vista ecológico, es decir, tener información de su número, masa, actividad y diversidad y relacionarlos con el sistema edáfico en el que viven.

Para poder caracterizar la población microbiana y evaluar su significado ecológico en un ambiente dado es necesario tener información de su número, masa, actividad y diversidad o estructura mediante una serie de métodos bioquímicos y microbiológicos. Se hace necesario, por tanto, caracterizar la población microbiana y determinar todos estos aspectos de la población microbiana que proporcionan distinta información sobre la misma, es decir, información complementaria y no excluyente, con el fin de determinar su papel en el ecosistema edáfico en el que viven. Sin embargo, a pesar de su interés, la información que se tiene hoy en día sobre la microbiota de los suelos quemados no es equiparable a los conocimientos sobre las propiedades físicas, químicas y físico-químicas.

Determinación del número de microorganismos

La cuantificación de los microorganismos puede hacerse por un recuento directo, realizado bajo microscopio (Jones y Mollison, 1948), o por recuentos indirectos mediante estimación, en tubos o placas de cultivo, de unidades viables (Parkinson et al., 1971). La observación directa determina la totalidad de la población, aunque tiene el inconveniente de que, además de ser muy laboriosa, incluye los microorganismos muertos, no diferenciando además las células activas de las inactivas o de las esporas. En los últimos años el uso del microscopio de epifluorescencia y la existencia de colorantes vitales fluorescentes ha permitido distinguir las partículas del suelo de los microorganismos y, a su vez, diferenciar los microorganismos vivos de los muertos. Los recuentos en tubo y placa dan información acerca de las células con actividad metabólica, que representan un pequeño porcentaje de la población determinada en los recuentos bajo microscopio dado que no todos los microorganismos presentes en el suelo crecen en un medio de cultivo determinado (Olsen y Bakken, 1987). Los recuentos de viables, además, presentan el inconveniente de que requieren que todo el proceso de recogida, manipulación y determinaciones analíticas deben realizarse en las condiciones de máxima asepsia, utilizando material estéril y trabajando a la llama de un mechero de gas o en una cámara de flujo laminar, lo cual puede ser una dificultad añadida a la hora de establecer dicha técnica como un método de rutina en los laboratorios.

La mayoría de los estudios de determinación del número de microorganismos realizados en suelos forestales quemados localizados en España se han realizado mediante recuentos de viables en tubo o placa, utilizando medios de crecimiento selectivos, de los principales grupos taxonómicos (algas, bacterias, hongos y actinobacterias) y grupos fisiológicos de microorganismos específicos de los ciclos del C (celulolíticos aerobios y anaerobios, amilolíticos, pectinolíticos), N (fijadores de N₂ aerobios y anaerobios, proteolíticos, amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes) y S (mineralizadores aerobios del S orgánico, oxidadores de sulfuros y de S elemental, reductores de sulfatos), siguiendo las recomendaciones dadas por Wollum (1982). Estos resultados han mostrado que como consecuencia de los incendios forestales y dependiendo de la severidad del fuego aumenta rápidamente y exponencialmente el número de bacterias a expensas del C y nutrientes liberados durante las primeras etapas del fuego y luego, una vez agotados los sustratos, la densidad se reduce de nuevo (estrategia "r" o microorganismos zimógenos). De manera similar, en un recuento en placa podremos encontrar valores altos de propágulos fúngicos que pueden proceder no sólo de los hongos que estén activos en el suelo sino también de la esporas liberadas tras de la perturbación inducida por el fuego. Estos resultados se contradicen, en cierta forma, con la disminución de biomasa microbiana determinada por el método de fumigación-extracción observada tras el impacto del fuego y atribuida fundamentalmente al descenso de los hongos que están más afectados por el fuego y además al ser eucariotas son los que más contribuyen a la biomasa microbiana total. Sin embargo, a pesar de la sobreestimación que se puede producir en los recuentos en placa de los hongos, frecuentemente se ha encontrado un impacto negativo del fuego mayor y más duradero en este grupo microbiano que en el de las bacterias en relación con el nivel de calentamiento del suelo y con los cambios en otros parámetros del suelo tales como pH o proporción de las distintas fracciones de materia orgánica (Vázquez et al., 1993; Acea y Carballas, 1996; Mataix, 1999; Badía y Martí, 2003; D'Ascoli et al., 2005; Guerrero et al., 2005; Bárcenas-Moreno y Bååth, 2009; Bárcenas et al., 2009; Carballas et al., 2009).

Tal como se comentó con anterioridad, los recuentos de viables presentan muchas limitaciones. Entre ellas, la de su representatividad dado que únicamente el 1-5 % de los microorganismos, generalmente los que siguen una estrategia "r" o zimógenos, pueden crecer en un medio de cultivo con unas determinadas condiciones (composición del medio, temperatura o tiempo de la incubación). Sin embargo estos recuentos de viables utilizando medios selectivos pueden ser de gran utilidad cuando se pretende evaluar el impacto del fuego sobre algún grupo taxonómico (bacterias, hongos, actinobacterias, algas) o grupo fisiológico (organismos nitrificantes o celulolíticos) de microorganismos. Además, a pesar de sus limitaciones, si se aplica el mismo método en todas las muestras de suelos quemados y sus correspondientes controles no quemados recogidas a distintos intervalos de tiempo después del impacto del fuego, los resultados siempre serán comparativos y permitirán evaluar la respuesta de al menos una parte de las comunidades microbianas frente al fuego. En este sentido, se ha observado que algunos grupos microbianos pueden resultar estimulados por el incendio, como los del ciclo del N en comparación a los mineralizadores del C (Fontúrbel, 1989; Acea et al., 1996), en relación a la intensidad del fuego (Vega et al., 2000).

Determinación de la biomasa microbiana

En lo que respecta a la biomasa microbiana se ha indicado que el N de la biomasa del suelo puede usarse para medir el N disponible para las plantas, que las medidas de biomasa del suelo pueden revelar a corto plazo cambios producidos por el manejo y tratamiento del suelo antes de que tales cambios se detecten por análisis químico en el C y N orgánico del suelo y que pueden servir como un indicador de toxicidad; finalmente, también se señala que es imprescindible conocer la cantidad de este "pool" lábil de la materia orgánica, la biomasa microbiana para comprender la dinámica de la materia orgánica del suelo (Jenkinson, 1988). Por tanto, se hace necesario cuantificar la biomasa microbiana, habiéndose desarrollado para ello métodos muy diversos que, aún actualmente, están sometidos a gran polémica y se están modificando continuamente.

La biomasa microbiana se determinaba por métodos directos, procedimientos de recuentos mediante los cuales se estima la biomasa a partir del número de microorganismos, determinada por observación directa o por recuento de viables, multiplicando este número por el volumen y la densidad de los microorganismos. Debido a su laboriosidad estos métodos no suelen utilizarse para la determinación de la biomasa microbiana. En los últimos años se han difundido ampliamente los métodos indirectos tales como la fumigación en sus múltiples variantes, los métodos fisiológicos o los métodos de extracción. En lo que respecta a la relación entre métodos, los resultados de un estudio realizado en suelos de la zona templado húmeda mostraron que, aunque la biomasa determinada por recuento de viables sólo representa una pequeña parte de la biomasa total determinada por el método de fumigación-incubación, ambas medidas estaban estrechamente relacionadas (Díaz-Raviña et al., 1988).

La fumigación del suelo con cloroformo provoca la muerte de la mayor parte de los microorganismos que lo habitan. La extracción subsiguiente del fumigante, seguida de la incubación del suelo en condiciones aerobias, permite la cuantificación de la biomasa microbiana a partir del CO₂ desprendido por el suelo fumigado (Jenkinson y Powlson, 1976). Brevemente, el suelo húmedo se expone a vapor de cloroformo, libre de etanol, durante 24 horas; luego, una vez extraído el fumigante, se adiciona un inóculo del 0,4% de suelo no fumigado y finalmente se incuban las muestras al 55% de la capacidad de campo, durante 10 días, a 25 °C. El C de la biomasa (Bc) viene dado por $Bc = Fc/Kc$, donde Kc es la fracción de biomasa muerta mineralizada a CO₂ cuando el suelo fumigado se incuba bajo condiciones estandarizadas, y Fc el flujo de mineralización durante la fumigación, calculado por diferencia entre el CO₂ desprendido por las muestras fumigadas (SF) y las no fumigadas (SNF), utilizadas como control, después de los 10 días de incubación. El valor de Kc utilizado, Kc = 0,5, se calculó adicionando al suelo cantidades conocidas de microorganismos, haciéndolos crecer "in vitro", fumigando y midiendo la proporción de C microbiano adicionado mineralizado en las mismas condiciones de incubación. El método original de fumigación-incubación (FI) tiene algunas limitaciones ya que es inapropiado para suelos fuertemente ácidos, suelos que han recibido aportes recientes y suelos encharcados. Conviene señalar, sin embargo, que se ha constatado que suelos ácidos de la zona templado húmeda pueden utilizarse esta técnica de fumigación-incubación para estimar la biomasa microbiana dado que los valores obtenidos son similares las estimaciones realizadas mediante la técnica de fumigación-extracción, la cual se sabe con certeza que da resultados satisfactorios (Díaz-Raviña

et al., 1993). En lo que respecta a la aplicación del método de fumigación-incubación a suelos quemados, en principio esta técnica no es aconsejable sobre todo en suelos con un pH ácido y en las muestras de suelo recogidas inmediatamente después del incendio debido al aporte extra de nutrientes liberados como consecuencia tanto de la combustión de la materia orgánica como de la muerte de los microorganismos debido a las temperaturas elevadas.

El método fisiológico (SIR) (Anderson y Domsch, 1978) utiliza como índice de biomasa el aumento inicial de la tasa de respiración después de la adición al suelo de un sustrato fácilmente metabolizables, generalmente glucosa. El sustrato debe aportarse en cantidad suficiente para saturar la capacidad de respiración del suelo, asumiéndose que en distintos suelos una fracción constante de la biomasa microbiana responde de forma similar a este aporte. El aumento de la tasa de respiración, producido poco tiempo después de la adición del sustrato (4-5 h) y antes de que la biomasa proliferare, se correlaciona con la biomasa inicial medida por el método de fumigación. El C de la biomasa viene dado por $x = 40,04 Y + 0,37$ ($r = 0,96$), donde x = biomasa microbiana (mg g^{-1} s.s.) e Y = tasa máxima de respiración a 22 °C ($\text{ml CO}_2 \text{ g}^{-1}$ s.s. h^{-1}). La aplicación de este método requiere, en cada suelo, la determinación previa de la concentración más baja de sustrato que induce la tasa máxima inicial de respiración, lo cual supone una desventaja, aunque la principal dificultad se debe a que las poblaciones microbianas de diferentes suelos muestran respuestas distintas frente a adiciones de un mismo sustrato. Por otra parte, dado que la respiración inducida por el sustrato se determina midiendo el CO_2 desprendido o el O_2 consumido (véase determinación de actividad microbiana), debe verificarse que estos gases no son originados por reacciones abióticas. En este sentido, si el suelo se ha quemado a altas temperaturas se pueden formar hidróxidos de calcio y magnesio, éstos últimos en menor proporción, los cuales una vez se humedezca el suelo podrán carbonatarse y distorsionar las medidas de CO_2 realizadas en un respirómetro o en las clásicas trampas con un álcali (NaOH y KOH) (el CO_2 liberado reacciona con los hidróxidos, se infraestima el CO_2 liberado e incluso se puede detectar fijación de CO_2). Asimismo, la determinación de CO_2 también puede presentar problemas en suelos neutros o calizos, con pH superiores a 6,5, ya que parte del CO_2 puede disolverse en la solución del suelo (Sparling y West, 1990). La medida de O_2 es probable que esté menos afectada por estos problemas, aunque no es accesible para muchos laboratorios. En cualquier caso, una incubación previa del suelo antes de la determinación, podrá atenuar estos efectos si bien es cierto que no proporciona información sobre las condiciones iniciales postincendio. Este método (SIR) ha sido eficazmente usado para evaluar el efecto del fuego en diferentes ecosistemas forestales quemados (Pietikäinen y Fritze, 1995; Dumontet et al., 1996; Michelsen et al., 2004), observándose reducciones de los valores habituales en comparación con suelos similares no alterados.

Una ventaja de este método de respiración inducida por sustrato es que combinado con la utilización de antibióticos selectivos que inhiben el crecimiento de bacterias o de hongos puede ser utilizado para cuantificar la contribución de los dos principales grupos microbianos del suelo, bacterias y hongos, a la actividad y/o biomasa microbiana total del suelo, lo cual puede ser de gran ayuda a la hora de entender el funcionamiento del ecosistema edáfico (Anderson y Domsch, 1975). El uso de antibióticos para realizar una inhibición selectiva de la microflora edáfica y medir la biomasa por SIR presenta también algunas limitaciones que han sido ampliamente descritas

por Lin y Brookes (1999) y que, básicamente, consisten en que los antibióticos usualmente utilizados: i) son, a menudo, insuficientemente específicos; ii) pueden ser inactivados por el suelo o degradados por los microorganismos supervivientes; y, iii) al suprimir selectivamente el metabolismo de bacterias o de hongos pueden dar lugar a una fuente de energía adicional para los microorganismos supervivientes.

Los métodos de extracción se basan en la medida de los componentes intracelulares liberados cuando las células se rompen (ultrasonidos o fumigación). Jenkinson y Ladd (1981) señalaron que el componente medido debe cumplir lo siguiente: i) estar presente en todos los microorganismos vivos del hábitat estudiado, en concentración constante y conocida; ii) estar ausente en las células muertas y en otras formas inertes de la materia orgánica del suelo; iii) poder extraerse de las muestras de suelo; y, iv) poder cuantificarse con un método exacto. Algunos de estos métodos de extracción son específicos para grupos determinados de la microbiota; así, por ejemplo, las determinaciones de ácido murámico (Millar y Casida, 1970), N-acetil glucosamina (Frankland et al., 1978), clorofila (Banse, 1977), lipopolisacáridos (Coates, 1977) y ergosterol (Seitz et al., 1979) se utilizan para procariontes, hongos, organismos fotosintéticos, bacterias gram-negativas y hongos, respectivamente; otros, tales como la técnica de determinación del adenosín-5'-trifosfato (ATP) (Jenkinson y Oades, 1979), el contenido en fosfolípidos de la membrana de los microorganismos (Frostegård et al., 1991) y los métodos del P (Brookes et al., 1982), S (Sagar et al., 1981), C (Vance et al., 1987) y N (Brookes et al., 1985) cuantifican la biomasa total del suelo. Dentro de estos últimos uno de los métodos más usados ha sido la medida de ATP, en la cual el ATP difundido de las células se detecta por el ensayo luciferín-luciferasa al ser la luz emitida en esta reacción proporcional a la concentración de ATP, aunque el ATP puede ser adsorbido sobre las partículas del suelo, provocando así interferencias en su extracción y cuantificación. La principal dificultad de la aplicación de este método está en la conversión de estas medidas de ATP a biomasa ya que aunque se aplica la fórmula: $C \text{ biomasa} = 120 \times \text{contenido de ATP}$, se sabe que el contenido de ATP de algunos microorganismos del suelo puede variar en función de su estado fisiológico y de las condiciones nutricionales. También se ha observado que la técnica de ATP puede proporcionar medidas erróneas de la estimación de biomasa en suelos que han recibido aportes recientes de sustratos (De Nobili et al., 1996), lo que en principio limitaría su uso en las muestras de suelos quemados recogidas inmediatamente después del incendio.

Aunque todos los métodos de determinación de biomasa microbiana tienen sus ventajas e inconvenientes, el método de fumigación-extracción (FE) parece ser el más adecuado por lo que su uso se ha generalizado. Esta metodología, basada en el mismo principio que el método convencional pero, al comprobarse que existe una estrecha relación entre el C y el N extraídos con K_2SO_4 inmediatamente después de la fumigación y el C y N de la biomasa determinados por el método de fumigación-incubación, se elimina el proceso de incubación y toda la problemática que éste conlleva. El C y el N de la biomasa vienen determinados por la diferencia entre el contenido de C o N extraído del suelo antes y 24 horas después de la fumigación, multiplicada esta diferencia por un factor de proporcionalidad determinado empíricamente. El uso de esta metodología se ha extendido rápidamente ya que pueden aplicarse a aquellos suelos en los que el método original tiene limitaciones, tales como suelos ácidos, suelos con aportes recientes, suelos inundados o suelos que inmovilizan N. Así pues, en principio esta técnica podría utilizarse

en suelos afectados por incendios forestales y suelos quemados. Sin embargo, dado que el quemado del suelo modifica drásticamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y antes de aplicar esta técnica por primera vez a estos suelos degradados es necesario comprobar que se cumplen las premisas del método, entre otras que el cloroformo no solubiliza otra materia orgánica que no sea el "pool" del carbono lábil de la biomasa microbiana, y que, por tanto, puede utilizarse en suelos afectados por incendios de baja, media y alta severidad.

Los resultados de un estudio realizado con un suelo ácido sometido a distintas temperaturas de calentamiento (160, 350 ó 600 °C) durante distintos períodos de tiempo mostraron que esta técnica de fumigación-extracción podía aplicarse satisfactoriamente para estimar el C y el N de la biomasa microbiana en suelos quemados (Díaz-Raviña et al., 1992), determinando el C y el N de los extractos de K_2SO_4 0,5 M procedentes de las muestras de suelo no fumigadas y fumigadas mediante digestión con dicromato potásico sin adición de HgO y digestión Kjeldahl, respectivamente. Hay que señalar, sin embargo, que inmediatamente después del incendio debido al incremento del C y N fácilmente extraíbles del suelo y a la baja densidad microbiana debido a la muerte por las temperaturas elevadas, la cuantificación de la biomasa por FE puede presentar dificultades. Esto es debido a la baja cantidad de C y N liberados de los microorganismos frente al elevado contenido de C y N del suelo y a la imprecisión de las medidas. En este caso se puede aplicar la técnica de FE después de una extracción previa del C y N del suelo con K_2SO_4 con el fin de reducir notablemente el contenido de estos elementos y aumentar así la precisión de las medidas del C y N de la biomasa (Widmer et al., 1989; Mueller et al., 1992). El método de fumigación-extracción se ha utilizado como una técnica de rutina para cuantificar el C y el N de la biomasa en suelos quemados tanto en condiciones de laboratorio como de campo, determinándose el C de los extractos mediante la digestión con dicromato potásico y determinación potenciométrica o colorimétrica y el N mediante digestión Kjeldahl y valoración potenciométrica o determinación colorimétrica del N-ninhidrina (Díaz-Raviña et al., 1992; Prieto et al., 1998; Guerrero, 2003). Los resultados de un estudio posterior han constatado que el C y el N de los extractos de K_2SO_4 también puede medirse en un analizador elemental de C y N, aunque, en este caso, es necesario utilizar K_2SO_4 en una concentración más diluida (0,05 M) para disminuir la cantidad de sales en los extractos y facilitar el análisis de C y N por combustión directa (Basanta et al., 2002, 2004).

Recientemente el uso de otros métodos de biomasa microbiana basados en la extracción de determinados componentes celulares tales como los fosfolípidos de las membranas celulares también se están utilizando con éxito en suelos quemados para determinar la biomasa total o la biomasa de grupos específicos de microorganismos tales como bacterias totales, bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y hongos (Díaz-Raviña et al., 2006).

En lo que respecta a la comparación de métodos de determinación de biomasa en algunos casos se han encontrado altas correlaciones entre SIR y FE en suelos quemados (por ejemplo Pietikäinen y Fritze, 1995; Dumontet et al., 1996; Michelsen et al., 2004), aunque no siempre la biomasa microbiana estimada con ambos métodos muestra la misma tendencia, ya que a veces la medida por SIR es superior a la realizada por FE, y otras veces, ocurre lo contrario (Pietikäinen y Fritze, 1995; Andersson et al., 2004). Estos resultados se pueden explicar, en parte, por la distinta información obtenida con estas dos metodologías ya que según algunos autores la medida

por SIR determina la biomasa activa, la de una parte de la población que responde fácilmente a la adición de glucosa y la medida por FE la biomasa total del suelo (Wardle y Parkinson, 1991). Por otra parte, las condiciones postincendio, con presencia de C y nutrientes, condiciones que favorecen el desarrollo de uno u otro grupo microbiano con diferente estrategia -tipo r o K-, tasa metabólica y respuesta a la glucosa, es probable que afecten de un modo diferente a los datos obtenidos con estas dos técnicas (el SIR es más susceptible), observándose por tanto una menor correlación entre las medidas de biomasa determinadas mediante estas dos técnicas.

Determinación de la actividad microbiana

La contribución de los microorganismos al funcionamiento del suelo depende no sólo de su abundancia sino también de su nivel de actividad. Una comunidad microbiana pequeña y metabólicamente activa podría tener el mismo impacto en el suelo que otra comunidad más grande pero menos activa; por eso, las medidas de biomasa microbiana deben ir acompañadas por medidas de su actividad. Los índices más comunes que se utilizan hoy en día para medir la actividad metabólica de la microbiota son la tasa de respiración, el nitrógeno mineralizable y la medida de actividades enzimáticas generales y específicas de los ciclos de los elementos.

La tasa de respiración se ha usado con frecuencia para determinar la actividad biológica del suelo utilizándose, sobre todo, para tratar, primero, de conocer los procesos de mineralización, relacionándolos con las propiedades físicas y químicas, condiciones climáticas y prácticas agrícolas y silvícolas e intentar, después, potenciar la mineralización endógena (Carballas et al., 1979; Díaz-Raviña et al., 1988). En la respiración, oxidación de la materia orgánica por los microorganismos aerobios, el oxígeno funciona como el aceptor final de electrones obteniéndose CO_2 y agua como productos finales de este proceso. La actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede, por tanto, determinarse mediante la medida del CO_2 desprendido o del oxígeno consumido tanto bajo condiciones naturales, es decir, "in situ", mediante medida directa en el campo, o en laboratorio, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Las medidas realizadas en campo y laboratorio proporcionan información distinta y a su vez complementaria; la respiración medida en campo, denominada respiración edáfica, es una medida de la actividad real que refleja la actividad biológica global del suelo -microbiota, raíces de las plantas y fauna del suelo- en condiciones naturales bajo unas determinadas condiciones de humedad y temperatura que sufren fluctuaciones y sobre suelo sin alterar; las medidas realizadas en laboratorio, denominadas respiración basal, es una medida de la actividad potencial que refleja únicamente la actividad de los microorganismos del suelo en muestras de suelo alteradas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura y los resultados, por tanto, son más fáciles de interpretar que los obtenidos bajo condiciones naturales (García et al., 2003). Las tasas de respiración son dependientes de la temperatura y de la humedad del suelo y, por tanto, de las condiciones climáticas, observándose que la temperatura es el factor que más influye en la respiración edáfica de zonas húmedas y frías mientras que las precipitaciones ejercen una mayor influencia en zonas áridas y semiáridas.

La respiración basal en el suelo viene determinada, fundamentalmente por la cantidad y calidad de la materia orgánica edáfica y, en menor medida, por las condiciones climáticas pre-

vias al muestreo, por otras propiedades edáficas y por la composición de los microorganismos del suelo, ya que los hongos contribuyen más a la respiración que las bacterias. La respiración basal es por lo tanto un buen índice del impacto del fuego. En el caso de las medidas de campo (respiración edáfica) las diferencias entre las tasas de respiración del suelo quemado y no quemado pueden deberse simplemente a cambios en la temperatura y en la distribución espacial y temporal de la humedad del suelo, resultando por tanto muy difícil a partir de estas medidas determinar el efecto del fuego sobre la cantidad y calidad de la materia orgánica e indirectamente sobre las poblaciones microbianas. Los datos de respiración en laboratorio y campo, al proporcionar información distinta, pueden incluso mostrar un patrón de comportamiento diferente; así, diversos estudios han puesto de manifiesto que aunque en el laboratorio los suelos quemados tenían menores tasas de respiración que los correspondientes controles no quemados, en el campo, debido a una mayor insolación y por consiguiente una mayor temperatura, se observaba lo contrario, es decir, había una mayor actividad en los suelos quemados (Bisset y Parkinson, 1980; Pietikäinen y Fritze, 1993).

Existen diversos métodos para la determinación de la respiración del suelo que van desde métodos gravimétricos y valoraciones volumétricas con un ácido para medir el CO₂ atrapado en disoluciones alcalinas, hasta métodos conductimétricos, cromatográficos (cromatografía de gases), espectrométricos (espectroscopía infrarroja) u otros. Los distintos métodos empleados en el laboratorio se basan en la medida del CO₂ desprendido durante la incubación del suelo en un sistema cerrado, en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, diferenciándose en el dispositivo de incubación empleado para la recogida de CO₂, en el método empleado para la determinación del CO₂, y en si se emplean o no sistemas de incubación y de medida automáticas. En lo que respecta a la duración de la incubación en la mayoría de los casos se utilizan tiempos cortos, desde 1-2 días en algunos sistemas automáticos (Anderson y Domsch, 1978; Sparling, 1995), pasando por 7-10 días en otros métodos en los que se analiza únicamente el CO₂ acumulado al final de la misma, hasta períodos mucho más largos de tiempo (12 semanas). Este último permite estudiar la cinética de mineralización diaria y acumulada y determinar los parámetros cinéticos mediante ajuste de las correspondientes curvas acumulativas a modelos matemáticos, puesto que las medidas pueden realizarse a distintos intervalos de tiempo. En lo que respecta a los suelos quemados hay que señalar que esta técnica ha resultado de gran utilidad a la hora de determinar el impacto de incendios forestales no controlados de diferente severidad (baja, media y alta) fuego sobre los distintos compartimentos de la materia orgánica del suelo (Carballas et al., 2009). Conviene señalar, además, que los métodos de incorporación celular de sustratos marcados tales como ³H-timidina y ¹⁴C-leucina, que proporcionan información sobre la síntesis de ADN y síntesis de proteínas, respectivamente, también se han sido utilizados con éxito para determinar la actividad bacteriana en suelos quemados (Díaz-Raviña et al., 1996).

La determinación del N mineralizable también puede utilizarse como una estima de la actividad microbiana, aunque el uso de esta metodología no está tan extendida como la del C mineralizable a causa de la naturaleza dinámica del ciclo de este nutriente en el ecosistema edáfico. Al igual que sucedía con el C, las metodologías se pueden dividir en dos grandes grupos, métodos de campo, en los que se realiza un proceso de incubación *in situ*, y métodos de laboratorio, en los que se incuban muestras homogéneas bajo condiciones de aeróbicas o anaeróbicas

a temperatura y humedad constantes. Una de las técnicas más utilizadas es la incubación aeróbica en el laboratorio de las muestras de suelo en condiciones controladas y la extracción periódica de réplicas para la determinación de las formas del N producidas durante un período de tiempo determinado, generalmente 2-12 semanas. En lo que respecta a suelos quemados, tal como se señaló con anterioridad, cuando se realizan incubaciones a largo plazo es conveniente utilizar en las determinaciones de C y N mineralizables la fracción de suelo < 4 mm. Sin embargo, en el caso de que se prefiera utilizar la fracción < 2 mm se recomienda mezclar el suelo con arena de cuarzo lavada al ácido para mejorar la aireación del medio edáfico.

Las enzimas del suelo, dado que determinan la pauta de gran parte de las transformaciones químicas que se producen en el mismo, también pueden considerarse útiles para monitorizar cambios en la actividad microbiana (Nannipieri et al., 1990). Las enzimas del suelo más estudiadas son las oxidoreductasas (en particular, deshidrogenasas, catalasas y peroxidasas) y las hidrolasas (sobre todo fosfatasa, proteasas y ureasa). La medida de la actividad de enzimas tales como las hidrolasas implicadas en los ciclos del C, N y P, en general, no se correlaciona con el grado de respiración o el número de microorganismos del suelo, debido, probablemente a que cada medida enzimática individual responde a cuestiones relativas a procesos metabólicos o a ciclos de nutrientes específicos. Por tanto, y dado que el término actividad biológica comprende un amplio espectro de procesos y actividades enzimáticas, para evaluar la actividad microbiana del suelo es necesario determinar simultáneamente varias actividades enzimáticas individuales.

De manera general, los métodos de medida de las actividades enzimáticas se basan en la incubación durante un corto período de tiempo, generalmente 1-3 h, y en condiciones óptimas para la actividad del enzima (concentración de sustrato adecuada, pH, temperatura) de las muestras con un sustrato determinado sobre el cual la enzima tiene especificidad y la cuantificación posterior, generalmente por colorimetría, de alguno de los productos generados como consecuencia de dicha actividad. Los sustratos y los productos finales medidos dependerán, lógicamente, de la enzima que se considere; por ejemplo, para la ureasa el sustrato es la urea y el producto que se cuantifica es amonio, para la fosfatasa ácida el sustrato suele ser *p*-nitrofenil fosfato y el producto final *p*-nitrofenol y en el caso de la β -glucosidasa el sustrato generalmente es *p*-nitrofenil- β -glucopiranosido y el producto es *p*-nitrofenol. Entre las limitaciones de estas técnicas es necesario señalar por una parte que no miden la actividad de los suelos en condiciones reales de campo, se mide la potencialidad de un suelo para una determinada actividad enzimática y, por otra, que algunas enzimas no son exclusivamente de origen microbiano y, además, pueden permanecer en el suelo activas y por ello desligadas de la presencia de los organismos que las han generado. Un problema adicional que surge en los suelos quemados es que las muestras suelen presentar materia orgánica semipirrolizada, lo que colorea los extractos de suelo y puede ocasionar dificultades en la cuantificación colorimétrica de los productos generados (por ejemplo *p*-nitrofenol); este problema agrava el inconveniente que ya tienen de por sí los suelos con alto contenido de materia orgánica (Alef y Nannipieri, 1995). En el caso de la ureasa, además, los valores altos de amonio, sobre todo en las primeras etapas postfuego, y la baja actividad de este enzima, que además de estar reducida por efecto del fuego suele estar inhibida por el producto final, es decir, por el amonio, dan lugar a medidas bastante imprecisas.

El estudio de la actividad de algunas enzimas del suelo, como la fosfatasa ácida, ha sido utilizado para evaluar el impacto del fuego, detectándose importantes reducciones en suelos quemados (Saá et al., 1993; Eivazi y Bayan, 1996) o cambios de escasa cuantía en relación con la menor severidad del fuego (Saá et al., 1993). Las diferencias de actividad halladas, en este y otros enzimas como β -glucosidasa, ureasa e hidrólisis del fluoresceína diacetato (FDA) después del fuego, pueden reflejar adecuadamente el calentamiento del suelo, así como las condiciones microclimáticas y la disponibilidad de sustratos postfuego (Serrasolsas y Khanna, 1995; Staddon et al., 1998a; Boerner et al., 2000; Basanta et al., 2002, 2003, 2004).

Durante los últimos años se han desarrollado una serie de parámetros ecofisiológicos que relacionan medidas de biomasa con medidas de actividad y proporcionan información adicional sobre la actividad de los microorganismos del suelo. Dentro de estos uno de los más usados es el qCO_2 o cociente metabólico, que se calcula dividiendo la tasa de respiración entre la biomasa microbiana, proporciona información sobre eficiencia en el uso del carbono por parte de los microorganismos. De acuerdo con algunos autores este coeficiente también puede ser indicador de estrés ya que bajo condiciones ecológicas más adversas (estrés) los microorganismos tendrán un mayor gasto energético (mayor respiración) aumentando el valor de este cociente y en condiciones de menor estrés podrán derivar más carbono para síntesis (crecimiento y producción) que para mantenimiento disminuyendo así los valores de qCO_2 menores. Típicamente, qCO_2 disminuye al pasar ecosistemas jóvenes o inmaduros a maduros o en estado de equilibrio o estabilidad (Doran et al., 1994; Wardle y Ghani, 1995). Sin embargo, dado que este parámetro está condicionado por muchos factores, su interpretación no es siempre sencilla; por ejemplo, en los suelos quemados durante las primeras etapas postfuego, la presencia de cenizas, materia orgánica fácilmente mineralizable y cambios en pH pueden favorecer la actividad microbiana sin que necesariamente implique condiciones ecológicas adversas o un estrés en las poblaciones, así, dos situaciones aparentemente contrarias, condiciones favorables debidas a la adición de sustratos lábiles y poblaciones en condiciones de estrés, pueden dar lugar a valores elevados de este cociente. Además, dado que por un lado las bacterias y hongos y, por otro, los microorganismos de crecimiento rápido (estrategia de supervivencia de la r) y los de crecimiento lento (estrategia de supervivencia de la K) difieren en su eficiencia en el uso del carbono, valores de qCO_2 variarán en función de la composición de la comunidad microbiana, es decir, de la proporción de biomasa bacteriana respecto a biomasa fúngica y de la abundancia de estrategias de la r y de la K. A pesar de los numerosos factores que determinan en menor o mayor medida el qCO_2 , éste ha sido utilizado eficazmente para evaluar el impacto del fuego en la biomasa microbiana, observándose generalmente aumentos de este coeficiente como resultado de la reducción de la biomasa microbiana (Fritze et al., 1994) y de un mayor porcentaje de microorganismos con estrategia de la r (Fritze et al., 1993; De Marco et al., 2005). La ausencia de cambios en este cociente algunos meses después de incendios cuando respiración y biomasa microbiana se han reducido, puede indicar una adaptación de las poblaciones microbianas a los cambios del ecosistema ocasionados por el fuego (Hernández et al., 1997).

Dado que el crecimiento y actividad de los microorganismos del suelo suelen estar limitados por la disponibilidad de sustrato, el carbono de la biomasa microbiana (C_{mic}) suele estar relacionado con el carbono orgánico total (C_{org}); por ello, la relación entre ambos (C_{mic}/C_{org}) per-

mite por un lado normalizar el dato de biomasa de manera que podamos comparar suelos con distintos contenidos en materia orgánica y, por otro, proporciona información sobre la calidad de la materia orgánica: proporción de C lábil proveniente de la biomasa microbiana en relación con el C orgánico total del suelo. Los cambios en la calidad de la materia orgánica, reducción de la fracción fácilmente biodegradable y el aumento de la fracción recalcitrante, observados después de incendios y debidos a que el fuego afecta principalmente a las fracciones más lábiles del C se refleja en valores reducidos de la relación C_{mic}/C_{org} en suelos quemados (Pietikäinen y Fritze, 1993; Hernández et al., 1997; Prieto-Fernandez et al., 1998). Del mismo modo, la relación respiración basal/ C_{org} también ofrece una visión similar de la labilidad de la materia orgánica, permitiendo la comparación entre muestras de suelos con contenidos en materia orgánica muy distinta, ya sea muestras de distintos suelos o muestras del mismo suelo recogidos en distintos tiempos. En conjunto, altos qCO_2 y bajos C_{mic}/C_{org} reflejan un uso menos eficiente de los sustratos orgánicos por la biomasa microbiana (Anderson, 2003) y una interdependencia estrecha entre crecimiento microbiano y mantenimiento. Por último, otros parámetros ecofisiológicos tales como la relación biomasa medida por SIR/biomasa medida por FE y el coeficiente metabólico o relación CO_2 emitido/ O_2 consumido que, aunque han sido menos utilizados, también pueden ser interesantes al proporcionar información sobre la biomasa activa respecto a la total y sobre los procesos catabólicos y el tipo de moléculas predominantemente mineralizadas por los microorganismos, respectivamente.

Determinación de la estructura de la comunidad microbiana

Tradicionalmente los programas de diversidad biológica del suelo se han centrado en plantas y animales. Sin embargo, a pesar de que se sabe que los microorganismos intervienen en el 80-90 % de los procesos y reacciones que se producen en el medio edáfico, la biodiversidad microbiana ha recibido poca atención (Nannipieri y Badalucco, 2003). Se estima que sólo el 13 % de las comunidades microbianas del suelo han sido identificadas, lo que significa que se desconocen la mayoría de las especies existentes y tampoco se sabe cuál es la biodiversidad necesaria, en cuanto a microorganismos, para que un suelo funcione de manera óptima. Actualmente se acepta que los microorganismos son los principales agentes responsables de la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas; por consiguiente, en una aproximación sostenible de la agricultura y la silvicultura resulta indispensable preservar y explotar la diversidad de los microorganismos que viven en el sistema suelo-planta con el fin de aprovechar y optimizar las funciones del ecosistema, ya que esto puede representar la reducción del aporte de fertilizantes y fitofármacos y contribuir a la conservación o establecimiento de sistemas estables y sostenibles (Barea y Olivares, 1998; Bardgett et al., 2005).

Los estudios microbiológicos realizados en los últimos años se han centrado en la determinación del número, masa y actividad de los organismos presentes en el medio edáfico, aspectos ya mencionados con anterioridad. La caracterización de la estructura, definida como la ordenación de los diferentes componentes de la comunidad microbiana, incluyendo número de especies y su abundancia relativa, su distribución espacial y los componentes abióticos asociados a esta distribución, también es determinante para comprender el funcionamiento del

suelo. Sin embargo, a pesar de su interés, la información concerniente a la estructura o diversidad de la microbiota edáfica es escasa, limitándose a unos pocos estudios realizados usando cultivos puros y recuentos de viables. Puesto que, como señalaron Olsen y Baken (1987), no todos los microorganismos crecen en un medio de cultivo determinado, no se dispone de información sobre la mayoría de la microbiota edáfica, y además los microorganismos cultivables representan sólo el 1-5 % de la población. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas que no conllevan el uso de un medio de cultivo y permiten, por tanto, el análisis estructural y funcional de la totalidad de las comunidades microbianas (Tunlip y White, 1992). Entre estas metodologías se incluyen el análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos, el análisis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y los métodos de análisis de la diversidad funcional como el BIOLOG, que representan un gran avance en ecología microbiana ya que su aplicación puede proporcionar información sobre la estructura de la comunidad a distintos niveles de organización que van desde una amplia descripción de la comunidad a la detección, muy específica, de determinadas secuencias de ADN.

La estructura de la comunidad microbiana puede ser estudiada mediante el análisis del ADN, una vez extraído del suelo y purificado (Torsvik et al., 1994). Las tres técnicas de biología molecular que están siendo adaptadas al ecosistema edáfico son el ensayo de hibridación-cruzada, que proporciona información sobre la similitud de ADN (ADN en común entre dos comunidades), los perfiles de desnaturalización del ADN, que proporcionan información sobre el contenido y distribución de bases en el ADN (% G+C) y la técnica de cinética de reasociación, que informa sobre la complejidad de la comunidad (ej. biodiversidad).

En lo que respecta a la diversidad funcional, el BIOLOG permite obtener de forma rápida información sobre el potencial metabólico de las comunidades microbianas analizando su capacidad para degradar diferentes sustratos carbonados de diferente labilidad (Garland, 1996; 1997; Garland et al., 1997). La tasa de utilización de los sustratos viene dada por la reducción de la sal de tetrazolio, cuyo color vira de incoloro a rosado. Cuando un microorganismo responde positivamente a una de las fuentes de carbono genera nicotinamida adenina dinucleótico (NADH) que es oxidado por la sal de tetrazolio, de modo que cuanto mayor sea la tasa de utilización de una fuente de C, mayor será la producción de NADH y mayor la reducción de la sal de tetrazolio. Las respuestas positivas en la microplaca son fácilmente observadas y pueden ser cuantificadas mediante espectrofotometría y mediante este procedimiento se puede evaluar un índice del desarrollo de color en la utilización de los sustratos de C, la riqueza y uniformidad de la respuesta y el patrón de utilización relativo de los sustratos; finalmente, podremos agrupar a las comunidades microbianas según las diferencias en el tipo y el grado de utilización de los sustratos. Una de las principales limitaciones de este método es que solamente algunas de las bacterias del suelo son capaces de crecer "in vitro", aunque generalmente lo hace una proporción mayor que las bacterias cultivables en medios con agar (Winding y Henrikson, 1997). Otro de los inconvenientes es que la utilización de sustratos depende en gran manera de la densidad del inóculo inicial, por lo que se necesita algún tipo de estandarización de los datos, sobre todo cuando se pretenden comparar suelos con muy diferentes densidades microbianas (Garland et al., 2001). En general, la mayor diversidad funcional de las comunidades microbianas es positiva, porque estabiliza el funcionamiento del ecosistema (Bardgett et al., 2005), por tanto en los suelos quemados debe-

ríamos observar una menor diversidad funcional que en los no quemados. Sin embargo, hasta el momento no existen datos claros a este respecto (Staddon et al., 1998b), lo que se debe probablemente a la compleja interpretación de los resultados obtenidos. Actualmente se considera que el BILOG es útil en experimentos exploratorios, con un elevado número de muestras, para una evaluación rápida de la diversidad estructural de las comunidades microbianas y para examinar los efectos temporales o espaciales de los experimentos pero los resultados obtenidos con esta técnica no deberían utilizarse por si solos para definir los factores que afectan a la estabilidad de la comunidad (Garland, 1997).

Aunque el estudio de las comunidades microbianas edáficas con técnicas moleculares está en una fase incipiente, actualmente uno de los métodos más usados para determinar la estructura o diversidad taxonómica de los microorganismos del suelo es el análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs, *phospholipids fatty acids*). Los fosfolípidos son componentes fundamentales de las membranas de todas las células vivas que se sintetizan durante el crecimiento celular y se degradan rápidamente tras la muerte celular y son, por tanto, buenos indicadores de la comunidad microbiana activa. Además, dado que algunos ácidos grasos de los fosfolípidos son característicos de determinados grupos microbianos (bacterias, actinobacterias, hongos, bacterias Gram-positivas (G⁺), bacterias Gram-negativas (G⁻), bacterias anaerobias, hongos endomicorrízicos y hongos totales, o bacterias sulfatoreductoras), el análisis de estos biomarcadores moleculares (PLFAs) permite obtener información sobre la composición cuantitativa y cualitativa de la comunidad microbiana y del estado fisiológico de los microorganismos.

Uno de los métodos más usados para analizar el perfil de los PLFAs es el descrito previamente por Frostegård et al. (1993), que identifica de 30 a 35 ácidos grasos distintos con 14-20 átomos de C. En síntesis, los PLFAs son extraídos del suelo con una mezcla de cloroformo, metanol y tampón citrato, separados en la fase orgánica (cloroformo) y fraccionados en columnas de ácido salicílico para separar los fosfolípidos (lípidos polares) de los restantes lípidos (lípidos neutros y glicolípidos). Finalmente, estos fosfolípidos serán sometidos a metanolisis para obtener ésteres metílicos de los ácidos, que pueden ser cuantificados por CG a partir de sus tiempos de retención relativos a los de los estándares internos (por ejemplo, 19:0 y 13:0). Los datos obtenidos en este análisis de los PLFAs permiten, por una parte, cuantificar la biomasa total y de grupos específicos de microorganismos y, por otra, cuantificar individualmente dentro de cada muestra la abundancia relativa de cada ácido graso con respecto a la totalidad de los ácidos grasos (porcentaje de cada ácido graso), estos datos tratados estadísticamente por análisis de componentes principales permiten identificar para el conjunto de muestras analizadas los principales factores que determinan la composición o estructura de las comunidades microbianas y detectar las principales diferencias en el perfil de los PLFAs en función de los tratamientos aplicados al suelo, proporcionando así información sobre los cambios inducidos en la estructura de la comunidad (Díaz-Raviña et al., 2006). La estructura o diversidad de la comunidad microbiana también se puede caracterizar a partir de los ácidos grasos totales; sin embargo, este análisis al no fraccionar el extracto lipídico total e incluir ácidos grasos de fuentes muy diversas (microbianas y no microbianas tales como ácidos grasos derivados de productos de almacenamiento y de membranas celulares o de la materia orgánica muerta) presenta el inconveniente de que no refleja la comunidad microbiana activa.

La mayoría de los estudios de diversidad microbiana realizados en suelos forestales quemados localizados en España se han realizado mediante recuentos de viables en tubo o placa, utilizando medios de crecimiento selectivos, de los principales grupos taxonómicos (algas, bacterias, hongos y actinobacterias) y grupos fisiológicos de microorganismos específicos de los ciclos del C (celulolíticos aerobios y anaerobios, amilolíticos, pectinolíticos), N (fijadores de N₂ aerobios y anaerobios, proteolíticos, amonificantes, nitrificantes y desnitrificantes) y S (mineralizadores aerobios del S orgánico, oxidadores de sulfuros y de S elemental, reductores de sulfatos) (Fontúrbel, 1989; Vázquez et al., 1993; Acea y Carballas, 1996; 1999; Mataix-Solera, 1999, Badía y Martí, 2003; Guerrero, 2003). Las limitaciones de estas técnicas y la problemática de su aplicación a suelos quemados ya han sido comentados con anterioridad en el apartado de determinación del número de microorganismos. El estudio de la estructura de la comunidad mediante el análisis de biomarcadores moleculares apenas se ha abordado, aunque los primeros resultados de la aplicación de estas técnicas en suelos quemados en el laboratorio y en suelos afectados por incendios no controlados son prometedores y parecen indicar que estas técnicas podrían utilizarse con éxito para estudiar tanto el impacto de los incendios forestales sobre la diversidad microbiana como la eficacia de diversas técnicas de recuperación de suelos. Así, mediante el análisis de los PLFAs se han podido cuantificar los cambios observados en la estructura de la comunidad microbiana como consecuencia de factores tales como el quemado del suelo, la textura y la aplicación de agentes retardantes de llama utilizados en la extinción de los incendios forestales (Díaz-Raviña et al., 2006). Conviene señalar, además, que este método presenta varias ventajas frente a otros métodos de estimación de propiedades bioquímicas y microbiológicas dado que: i) es un análisis muy robusto que permite detectar 30-35 biomarcadores moleculares al mismo tiempo y exactamente en la misma muestra de suelo; ii) analiza la estructura o diversidad de la totalidad de la comunidad microbiana - bacterias, actinobacterias y hongos- y no sólo un grupo específico de microorganismos tales como por ejemplo el recuento de viables, la medida de actividades enzimáticas o las técnicas de análisis de ADN o BIOLOG; iii) refleja dos aspectos de la microbiota que son la estructura y la masa de la población (biomasa total y biomasa de grupos específicos de microorganismos); y, finalmente, iv) es un indicador muy sensible capaz de detectar los efectos a corto, medio y largo plazo de los incendios forestales sobre la microbiota edáfica.

De todo lo expuesto se deduce que el análisis de los PLFAs, al reflejar la respuesta de la totalidad de la comunidad microbiana del suelo en condiciones "in situ", podría proporcionar información de gran interés en los estudios de evaluación del impacto de los incendios forestales sobre la calidad del suelo dado que si a nivel global la estructura de la comunidad microbiana está afectada es muy probable que también lo esté el funcionamiento del ecosistema edáfico. Por tanto, esta tecnología presenta un enorme potencial para ser utilizada en la toma de decisiones sobre la gestión de los ecosistemas forestales quemados al permitir comparar a la vez y a nivel global, mediante análisis multivariante de los 30-35 ácidos grasos analizados, comunidades microbianas afectadas y no afectadas por incendios forestales a diferentes intervalos de tiempo, y establecer las similitudes y diferencias que existen entre ellas determinando la importancia de las modificaciones inducidas por el fuego -cambios producidos y magnitud de los mismos- e identificando los principales ácidos grasos responsables de dichas modificaciones. Así pues, dada la rele-

vancia ecológica de la información obtenida con el análisis de PLFAs, es de esperar que en un futuro próximo pueda utilizarse como una técnica de rutina en la mayoría de los laboratorios para caracterizar las comunidades microbianas de suelos afectados por incendios forestales no controlados o quemas prescritas con el fin de detectar y monitorizar el impacto del incendio a lo largo del tiempo, examinar la recuperación natural del ecosistema edáfico tras dicho impacto y/o evaluar la eficacia de recuperación de distintas técnicas de recuperación de suelos quemados.

CONCLUSIONES

La microbiota edáfica puede caracterizarse mediante el análisis de diversas propiedades bioquímicas y microbiológicas basadas en el número, masa, actividad y diversidad microbianas, siendo necesaria la información de todos estos aspectos de la misma para poder evaluar su significado ecológico. La densidad y composición de la comunidad microbiana viene determinada por un conjunto de factores bióticos y abióticos; así, dado que los microorganismos reflejan las condiciones del medio en el que viven, cuando el ecosistema es alterado a causa del impacto producido por el fuego, la comunidad microbiana responderá rápidamente adaptándose a las nuevas condiciones del medio y esta respuesta puede medirse gracias a los cambios observados en su número, masa, actividad y diversidad de dicha comunidad. Por consiguiente, puesto que el fuego afecta significativamente a la población microbiana, ésta puede utilizarse como un marcador ecológico, es decir, como un parámetro indicador de los cambios inducidos en la calidad del suelo debido al impacto del fuego. A este respecto la utilización de la microbiota edáfica como bioindicador presenta indudables ventajas frente a otros indicadores basados en el análisis de determinadas propiedades físicas, físico-químicas y químicas del suelo ya que, por una parte, es un indicador global –que integra la influencia de los múltiples factores que interactúan en el medio edáfico– y, por otra es un indicador muy sensible capaz de detectar a muy corto plazo los cambios producidos en el suelo, pudiendo resultar, por tanto, de gran utilidad a la hora de la toma de decisiones en la gestión de los suelos forestales quemados.

Las distintas propiedades bioquímicas y microbiológicas analizadas presentan una diferente sensibilidad a la hora de detectar los cambios producidos en la calidad del suelo. De los estudios llevados a cabo en suelos quemados localizados en la zona templado húmeda y en la zona semiárida (Fontúrbel, 1989; Acea y Carballas, 1996, 1999; Fontúrbel et al., 1995, 2008; Badía y Martí, 2003; Guerrero, 2003; Guerrero et al., 2005; Carballas et al., 2009; Mataix-Solera et al., 2009a,b) puede deducirse que: i) la estimación del número total de microorganismos por recuento de viables, dado que proporcionan información acerca de las células con actividad metabólica, permiten detectar a corto plazo las modificaciones producidas por el fuego en el ecosistema edáfico; ii) que las medidas de biomasa microbiana suelen ser buenos indicadores tanto a corto como a medio plazo; iii) los distintos parámetros de estimación de actividad microbiana presentan una diferente sensibilidad frente a los cambios, en general, los resultados de los ensayos de laboratorio suelen ser satisfactorios a corto plazo, sin embargo, en las experiencias de campo, se observaron resultados no satisfactorios en numerosas ocasiones debido, probablemente, a la dificultad de separar el impacto del fuego del efecto de las condiciones ambientales; iv) que las medidas de

diversidad microbiana suelen ser buenos indicadores de los cambios inducidos por el fuego independientemente del tiempo transcurrido. Por tanto, aunque en principio, cualquiera de los parámetros bioquímicos y microbiológicos podría utilizarse como indicador de las modificaciones producidas en la calidad del suelo como consecuencia del impacto producido por los incendios forestales no controlados, quemas prescritas o fuegos experimentales, dependiendo de los objetivos del estudio y del tiempo transcurrido desde la alteración del ecosistema es conveniente analizar una u otra propiedad. Así, por ejemplo, para la detección a corto plazo de los cambios producidos en la calidad del suelo puede emplearse cualquiera de parámetros de la microbiota antes señalados y que están basados en el número, masa, actividad y diversidad de los microorganismos. Para la detección a medio y/o largo plazo es imprescindible analizar la estructura de la comunidad (recuento de viables, PLFA); las estimaciones del número, masa y actividad microbiana pueden resultar inadecuadas. Por último, si el objetivo final es la conservación y/o recuperación de suelos entonces será necesario no sólo caracterizar la población microbiana sino también estudiar los procesos microbianos que ocurren en el mismo para poder entender el funcionamiento del ecosistema y, posteriormente, proceder a su conservación y/o recuperación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Xunta de Galicia (proyecto 08MRU002400PR, otros) y al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación (proyectos AGL2008-02823, INIA RTA2007-00111-C02-01) obtenida para la realización de la investigación.

REFERENCIAS

- Acea, M.J. y Carballas, T. 1996. Changes in physiological groups of microorganisms in soil following wildfire. *FEMS Microbial Ecology*, 20, 33-39.
- Acea, M.J. y Carballas, T. 1999. Microbial fluctuations alter soil heating and organic amendment. *Bioresource Technology*, 67, 67-71.
- Ahlgren, I.F. y Ahlgren, C.E. 1965. Effects of prescribed burning on soil microorganisms in a Minnesota pine forest. *Ecology*, 46, 304-310.
- Alef, K. y Nannipieri P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, England.
- Anderson, J.P.E. y Domsch, K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 10, 215-221.
- Anderson, J.P.E. y Domsch, K.H. 1975. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 315-322.
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agricultural, Ecosystems and Environment*, 98, 285-293.
- Andersson, M., Michelsen, A., Jensen, M. y Kjölller, A. 2004. Tropical savannah woodland: effects of experimental fire on soil microorganisms and soil emissions of carbon dioxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 849-858.
- Badía, D. y Martí, C. 2003. Effect of simulated fire on organic matter and selected microbiological properties of two contrasting soils. *Arid Land Research and Management*, 17, 55-69.
- Banase, K. 1977. Determining the carbon to chlorophyll ratio of natural phytoplankton. *Marine Biology*, 41, 199-212.

- Bárceñas-Moreno, G. y Bååth, E. 2009. Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures to simulated a range of fire intensities. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 2517-2526.
- Bárceñas, G., Guerrero, C. y Bååth, E. 2009. Bacterial and fungal growth in soil heated at different temperatures. Abstracts of 2nd International Meeting of Fire Effects on Soil Properties. Turkey. Pp: 44.
- Bardgett, R.D, Usher, M.B. y Hopkins, D.W. 2005. Biological diversity and function of soils. Cambridge University Press. Cambridge.
- Barea, J.M. y Olivares, J. 1998. Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: R.M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa (Eds.), *Agricultura Sostenible. Agrofuturo Life-Mundi* Prensa. Madrid. Pp.: 173-193.
- Basanta, M.R., Díaz-Raviña, M, Cuiñas, P. y Carballas, T. 2004. Field data of microbial response to a fire retardant. *Agrochimica*, 48, 51-60.
- Basanta, M.R., Díaz-Raviña, M. y Carballas, T. 2003. Microbial biomass and metabolic activity in a forest soil treated with an acrylamide copolymer. Field data of microbial response to a fire retardant. *Agrochimica*, 47, 9-13.
- Basanta, M.R., Díaz-Raviña, M., González-Prieto, S.J. y Carballas, T. 2002. Biochemical properties of forest soils affected by a fire retardant. *Biology and Fertility of Soils*, 36, 377-383.
- Bissett, J. y Parkinson, D. 1980. Long-term effects of fire on the composition and activity of the soil microflora of a subalpine, coniferous forest. *Canadian Journal Botany*, 58, 1704-1721.
- Boerner, R.E.J., Deckler, K.L.M. y Sutherland, E.K. 2000. Prescribed burning effects on soil enzyme activity in a southern Ohio hardwood forest: a landscape-scale analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 899-908.
- Brookes, P.C., Landman, A., Powlson, D.S. y Jenkinson, D.S. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method for measuring microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 17, 837-842.
- Brookes, P.C., Powlson, D.S. y Jenkinson, D.S. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 14, 319-329.
- Carballas, M., Carballas, T. y Jacquin, F. 1979. Biodegradation and humification of organic matter in humiferous atlantic soils. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 38, 1699-1717.
- Carballas, T., Martín, A. y Díaz-Raviña, M. 2009. Efecto de los incendios forestales sobre los suelos de Galicia. En: A. Cerdá y J. Mataix-Solera (Eds.), *Efectos de los incendios forestales sobre los suelos en España. El estado de la cuestión visto por los científicos españoles. Cátedra de Divulgación de la Ciencia-Fuego-red*. Valencia. pp 269-301.
- Coates, A. 1977. Enhancement of the sensitivity of the *Limulus* assay for the detection of Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 445-449.
- D'Ascoli, R., Rutigliano, F.A., De Pascale, R.A., Gentile, A. y Virzo de Santo, A. 2005. Functional Diversity of the microbial community in Mediterranean maquis soils as affected by fires. *International Journal of WildlandFire*, 14, 355-363.
- De Marco, A., Gentile, A.E., Arena, A. y Virzo de Santo, A. 2005. Organic matter, nutrient content and biological activity in burned and unburned soils of a Medi-terranean maquis area of southern Italy. *International Journal of Wildland Fire*, 14, 365-377.
- De Nobili, M., Díaz-Raviña, M., Brookes, P.C. y Jenkinson, D.S. 1996. Adenosine 5'-triphosphate measurements in soils containing recently added glucose. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 1099-1104.
- Díaz-Raviña, M. 1990. Biomasa y actividad microbiana en ecosistemas edáficos. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.
- Díaz-Raviña, M., Acea, M.J. y Carballas, T. 1993. Microbial biomass and C and N mineralization in forest soils. *Bioresource Technology*, 43, 161-167.
- Díaz-Raviña, M., Bååth, E., Martín, A., Carballas, T. 2006. Microbial community structure in forest soils treated with a fire retardant. *Biology and Fertility of Soils*, 42, 465-471.

- Díaz-Raviña, M., Carballas, T. y Acea, M.J. 1988. Microbial biomass and metabolic activity in four acid soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 20, 817-823.
- Díaz-Raviña, M., Prieto, A. y Bååth, E. 1996. Bacterial activity in a forest soils after soil heating and organic amendments measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 419-426.
- Díaz-Raviña, M., Prieto, A., Acea, M.J. y Carballas, T. 1992. Fumigation-extraction method to estimate microbial biomass in heated soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 24, 259-264.
- Domsch, K.H. 1984. Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil*, 76, 367-378.
- Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdiceb, D.F., Stewart, B.A. 1994. Defining soil quality for a sustainable environment. *Soil Science Society of America, Special Publication 35*. Madison, WI. Pp.: 3-21.
- Dumontet, S., Dinel, H., Scopa, A., Mazzaruta, A. y Saracino, A. 1996. Post-fire soil microbial biomass and nutrient content of a pine forest soil from a dunal mediterranean environment. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 1467-1475.
- Eivazi, F. y Bayan, M.R. 1996. Effects of long-term prescribed burning on the activity of select soil enzymes in an oak-hickory forest. *Canadian Journal Forest research*, 26, 1799-1804.
- Fontúrbel, M.T. 1989. Efectos del fuego prescrito e incendios en pinares sobre las poblaciones microbianas del suelo. Tesis Doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.
- Fontúrbel, M.T., Vega, J.A., Bará, S. y Bernández, I. 1995. Influence of prescribed burning of Pine stands in N.W. Spain on soil microorganisms. *European Journal of Soil Biology*, 31, 13-20.
- Fontúrbel, M.T., Vega, J.A., Fernández, C., Pérez-Gorostiaga, P. y Jiménez, E. 2008. Influencia del fuego, corta a hecho y tratamiento de residuos postincendio en una masa de *P. pinaster* en Galicia sobre parámetros edáficos seleccionados. *Cuadernos Sociedad Española Ciencias Forestales*, 25, 185-191.
- Frankland, J.C., Lindley, D.K. y Swift, M.J. 1978. A comparison of two methods for the estimation of microbial biomass in leaf litter. *Soil Biology & Biochemistry*, 10, 323-33.
- Fritze, H., Pennanen, T. y Pietikäinen, J. 1993. Recovery of soil microbial biomass and activity from prescribed burning. *Canadian Journal of Forest Research*, 23, 1286-1290.
- Fritze, H., Smolander, A., Levula, T., Kitunen, V. y Malkonen, E. 1994. Wood-ash fertilization and fire treatments in a Scots pine forest and microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 57-63.
- Frostegård, A., Bååth, E. y Tunlip, A. 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 25, 723-730.
- Frostegård, A., Tunlip, A. y Bååth, E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 151-163.
- García, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa. Madrid.
- Garland, J.L. 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential carbon source utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 223-230.
- Garland J.L. 1997. Analysis and interpretation of community level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbial Ecology*, 24, 289-300.
- Garland, J.L., Cook, K.L., Loader, C.A. y Hungate, B.A. 1997. The influence of microbial community structure and function on community-level physiological profiles. En: H. Insam y A. Rangger (Eds.), *Microbial Communities: functional versus structural approaches*. Springer. Hiedelberg. Pp.: 171-183.
- Garland, J.L., Mill, A.L. y Young, J.S. 2001. Relative effectiveness of kinetic análisis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1059-1066.

- Guerrero, C. 2003. Uso de diferentes residuos orgánicos en la restauración de suelos forestales quemados. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández. Elche.
- Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Gómez, I., García-Orenes, F. y Jordán, M.M. 2005. Microbial recolonization and chemical changes in a soil heated at different temperatures. *International Journal of Wildland Fire*, 14, 385-440.
- Hernández, T.; García, C. y Reinhardt, I. 1997. Short-term effect of wildfire on the chemical, biochemical and microbiological properties of Mediterranean pine forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 25, 109-116.
- Jenkinson, D.S. 1988. Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. En: J.R. Wilson (Ed.), *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. CAB International. Wallingford. Pp.: 368-386.
- Jenkinson, D.S. y Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. En: Paul E.A., Ladd J.N. (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 5. Marcel Dekker. New York. Pp.: 415-471.
- Jenkinson, D.S. y Oades, J.M. 1979. A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 11, 193-199.
- Jenkinson, D.S. y Powlson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, 8, 209-213.
- Jones, P.C.Y. y Mollison, J.E. 1948. A technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *Journal General Microbiology*, 2, 54-69.
- LeDuc, D. y Rothstein, D.E. 2007. Initial recovery of soil carbon and nitrogen pools and dynamics following disturbance in jack pine forest: a comparison of wildfire and clearcut harvesting. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 2865-2876.
- Lin, Q. y Brookes, P.C. 1999. An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biology & Biochemistry*, 31, 1969-1983.
- Liu, Y., Yao, H. y Huang, C. 2009. Assessing the effect of air-drying and storage on microbial biomass and community structure in paddy soil. *Plant and Soil*, 31, 213-221.
- Martin, A. Díaz-Raviña, M. y Carballas, T. 2009. Evolution of composition and content of soil carbohydrates following forest wildfires. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 511-520.
- Mataix-Solera, J. 1999. Alteraciones físicas, químicas y biológicas en suelos afectados por incendios forestales. Contribución a su conservación y regeneración. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Alicante.
- Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arangucci, V., Bárcenas, G.M., Zornoza, R., Pérez-Berenjano, A., Bodía, M., Mataix-Bebeyto, J., Gomez, I., García-Orenes, F., Navarro-Pedreño, J., Jordán, M.M., Cerdá, A., Doerr, H., Úbeda, X., Outeiro, L., Pereira, P., Jordán, A. y Zavala, L. 2009a. Los incendios forestales y el suelo: un resumen de la investigación realizada por el Grupo de Edafología Ambiental de la UMH en colaboración con otros grupos. En: A. Cerdá y J. Mataix-Solera (Eds.), *Efectos de los incendios forestales sobre los suelos de España. El estado de la cuestión visto por los científicos españoles*. Cátedra Divulgación de la Ciencia, Universitat de València. Valencia. Pp.: 185-217.
- Mataix-Solera, J., Guerrero, C., García-Orenes, F., Bárcenas, G.M. y Torres, M.P. 2009b. Forest fire effects on soil microbiology. En: A. Cerdá y P.R. Robichaud (Eds.), *Fire effects on soils and restoration strategies*. Vol 5. Land reconstruction and management. Science Publishers. New Hampshire. Pp.: 133-175.
- Michelsen, A., Andersson, A., Jensen, M., Kjølter, A. y Gashew, M. 2004. Tropical savannah woodland: effects of experimental fire on soil microorganisms and soil emissions of carbon dioxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 849-858.
- Millar, W.B. y Casida L.E. 1970. Evidence for muramic acid in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 16, 299-304.
- Mueller, T., Joergensen, R.G. y Meyer, B. 1992. estimation of soil microbial biomass C in the presence of fresh roots by fumigation-extraction. *Soil Biology & Biochemistry*, 24, 179-181.

- Nannipieri, P. y Badalucco, L. 2003. Biological processes. En: D.K. Bembí y R. Nieder (Eds.), Processes in the soil-plant system: Modelling concepts and applications. The Haworth Press. Binghamton, NY. Pp.: 57-82.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B. y Grego, S. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. En: J.M. Bollag y G. Stotzky (Eds.), Soil Biochemistry, Vol 6. Marcel Dekker. New York. Pp.: 293-355.
- Olsen, R. y Bakken, L.R. 1987. Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts with different size groups. Microbial Ecology, 13, 59-74.
- Pankhurst, C., Doube, B.M. y Gupta, V.V.S.R. 1998. Biological Indicators of Soil Health. CAB International. Wallingford.
- Parkinson, D., Gray, T.R.G. y Williams, S.T. 1971. Methods for studying the ecology of soil microorganisms. IBP. Handbook 19. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Pietikäinen, J. y Fritze, H. 1993. Microbial biomass and activity in the humus layer following burning: short-term effects of two different fires. Canadian Journal of Forest Research, 23, 1275-1285.
- Pietikäinen, J. y Fritze, H. 1995. Clear-cutting and prescribed burning in coniferous forest: comparison of effects on soil fungal and total microbial biomass, respiration activity and nitrification. Soil Biology & Biochemistry, 27, 101-109.
- Prieto-Fernández, A., Acea M.J. y Carballas, T. 1998. Soil microbial and extractable C and N after wildfire. Biology and Fertility of Soils, 27, 132-142.
- Saá, A., Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. y Carballas, T. 1993. Changes in soil phosphorus and acid phosphatase activity immediately following forest fires. Soil Biology & Biochemistry, 25, 1223-1230.
- Sagar, S., Bettany, J.R. y Stewart, J.W.B. 1981. Measurement of microbial sulphur in soils. Soil Biology & Biochemistry, 13, 493-498.
- Seitz, L.M., Sauer, D.B., Burroughs, R., Mohr, H.E. y Hubbard, J.D. 1979. Ergosterol as a measure of fungal growth. Phytopathology, 69, 1202-1203.
- Serrasolsas, I. y Khanna, P. K. 1995. Changes in heated and autoclaved forest soils of S.E. Australia. II. Phosphorus and phosphatase activity. Biochemistry, 29, 25-41.
- Sparling, G.P. 1995. The substrate induced respiration method. En: K. Alef y P. Nannipieri (Eds.), Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London. Pp. : 394-404.
- Sparling, G.P. y West, A.W. 1990. A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass. Pedobiologia, 34, 103-112.
- Staddon, W.J., Duchesne, L.C. y Trevors, J.T. 1998a. Acid phosphate, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities in soils from a jack pine (*Pinus banksiana Lamb.*) ecosystem after clear-cutting, prescribed burning, and scarification. Biology and Fertility of Soils, 27, 1-4.
- Staddon, W.J., Duchesne, L.C. y Trevors, J.T. 1998b. Impact of clear-cutting and prescribed burning on microbial diversity and community structure in a Jack pine (*Pinus banksiana Lamb.*) clear-cut using BIOLOG gram-negative microplates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 119-123.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., Sørheim, R., Michalsen, J. y Salte, K. 1994. Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. En: Ritz K., Dighton J., Giller K.E. (Eds.), Beyond the Biomass: compositional and functional analysis of soil microbial communities. John Wiley & Sons. Chichester, United Kingdom. Pp.: 39-48.
- Tunlip, A. y White, D.C. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of microbial communities in soil. En: G. Stotzky y J.M. Bollag (Eds.), Soil Biochemistry Vol. 7. Marcel Dekker. New York, NY. Pp.: 229-262.
- Vance, E.D., Brookes, P.C. y Jenkinson, D.S. 1987. A extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology & Biochemistry, 19, 703-707.
- Vázquez, F.J., Acea, M.J. y Carballas, T. 1993. Soil microbial populations alter wildfire. FEMS Microbial Ecology, 13, 93-104.

- Vega, J. A., Landsberg, J., Bará, S., Paysen, T., Fontúrbel, M. T. y Alonso, M. 2000. Efectos del fuego prescrito sobre los suelos de montes de *P. pinaster*. En: R. Vélez (Ed.), La defensa contra incendios forestales. Fundamentos y experiencias. IV. McGraw-Hill. Pp.: 14.61-14.62.
- Villar, M.C., Petrikova, V., Díaz-raviña, M. y Carballas, T. 2004. Changes in soil microbial biomass and aggregate stability following burning and soil rehabilitation. *Geoderma*, 122, 73-82.
- Wardle, D.A. y Ghani, A.. 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology & Biochemistry*, 27, 1601-1610.
- Wardle, D.A. y Parkinson, D. 1991. A statistical evaluation of equations for predicting total microbial biomass carbon using physiological and biochemical methods. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 34, 75-86.
- Weaver, R.W., Angle, J.S. y Bottomley, P.J. 1994. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series No. 5. Soil Science Society of America. Madison, WI.
- Widmer, P., Brookes, P.C. y Parry, L.C. 1989. Microbial biomass measurements in soils containing large amounts of inorganic nitrogen. *Soil Biology & Biochemistry*, 21, 865-867.
- Winding, A. y Hendrickson, N.B. 1997. Biolog assay for metabolic fingerprints of soil bacteria: incubation time and sensitivity. En: H. Insam, y A. Rangger (Eds.), *Microbial Communities: functional versus structural approaches*. Springer, Hiedelberg. Pp.: 195-205.
- Wollum, A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. En: A.L. Page (Ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy. Madison, WI. Pp.: 781-802.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Arcenegui, V., García-Orenes, F. y Mataix-Beneyto, J. 2006. Assessing air-drying and rewetting pre-treatment effect on some soil enzyme activities under Mediterranean conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2125-2134.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Arcenegui, V., García-Orenes, F. y Mataix-Beneyto, J. 2007. *European Journal of Soil Biology*, 43, 120-129.
- Zornoza, R., Mataix-Solera, J., Guerrero, C., Arcenegui, V. y Mataix-Beneyto, J. 2009. Storage effects on biochemical properties of air-dried soil samples from southeastern Spain. *Arid Land Research and Management*, 23, 267-282.

