

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN SUELO DE ORIGEN VOLCÁNICO EN
PRESENCIA DE LOMBRICES Y BIOCARBÓN**

POR

IGNACIO SEBASTIÁN DE LA FUENTE ORYAN

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

CONCEPCIÓN – CHILE

2024

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN UN SUELO DE ORIGEN VOLCÁNICO EN
PRESENCIA DE LOMBRICES Y BIOCARBÓN**

POR

IGNACIO SEBASTIÁN DE LA FUENTE O'RYAN

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

CONCEPCIÓN – CHILE

2024

Aprobada por:

Profesor Asociado, Cristina Muñoz V.
Ing. Agrónomo, Dr. Cs. De Recursos Naturales

Guía

Profesor Titular, Erick Zagal V.
Ing. en, Ph. D. in Soil Fertility/Plant Nutrition

Asesor

Profesor Asociado, Marco Sandoval E.
Ing. Agrónomo, Dr. Cs. Ambientales

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs. Mención Producción Animal

Decano

RECONOCIMIENTOS

A los proyectos MEC 80190011 y FONDECYT 120503 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por financiar la investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y métodos.....	4
Desarrollo y Discusión.....	11
Conclusiones.....	18
Referencias.....	19

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Respiración acumulada de suelo.....	14
Figura 2 Actividad deshidrogenasa en suelo sometido a diferentes tratamientos.....	16
Figura 3 Actividad proteasa en suelo sometido a diferentes tratamientos.....	17
Figura 4 Actividad β -Glucosidasa en suelo sometido a diferentes tratamientos.....	17
Tabla 1 Diseño experimental.....	4
Tabla 2 Características físicas y químicas del biocarbón	12
Tabla 3 Número de lombrices y huevos de <i>Aporrectodea</i> <i>caliginosa</i>	12
Tabla 4 Contenido de materia orgánica (MO) y carbono total (CT) del suelo sometido a diferentes tratamientos.....	13
Tabla 5 Contenido de N mineral en el suelo al finalizar el período de incubación.....	15
Tabla 6 Actividad enzimática carboxilesteresasa, catalasa, fosfatasa ácida, fosfodiesterasa, β -glucosaminidasa de los suelos sometidos a los tratamientos.....	16

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN SUELO DE ORIGEN VOLCÁNICO EN PRESENCIA DE LOMBRICES Y BIOCARBÓN.

ENZYMATIC ACTIVITY OF A SOIL OF VOLCANIC ORIGIN IN THE PRESENCE OF WORMS AND BIOCHAR.

Palabras clave: *Aporrectodea caliginosa*, carbono, nitrógeno, bioquímica de suelos.

RESUMEN

Los suelos, esenciales para el bienestar humano y ecosistémico, enfrentan amenazas como la compactación y pérdida de diversidad. Las lombrices de tierra desempeñan un papel clave en el equilibrio del suelo, influyendo en la biodiversidad y procesos biogeoquímicos. Este estudio analiza cómo la presencia de lombrices y biocarbón afecta la actividad enzimática del suelo. Utilizando un mesocosmo con cuatro tratamientos (suelo control, suelo con biocarbón, suelo con lombrices, y suelo con lombrices y biocarbón), se evaluaron diez enzimas importantes para la calidad ambiental y agronómica. Los resultados indicaron que la combinación de biocarbón y lombrices aumentó significativamente la actividad de las enzimas proteasa y glucosidasa, mejorando la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes. Se destaca que el biocarbón con sus propiedades beneficiosas como alta recalcitrancia y pH alcalino, puede complementar los efectos positivos de las lombrices, aunque las interacciones biológicas aún son poco comprendidas. En conclusión, este estudio demuestra que el uso combinado de lombrices y biocarbón podría ser una estrategia efectiva para mejorar la calidad del suelo.

SUMMARY

Soils, essential for human and ecosystem well-being, face threats such as compaction and loss of diversity. Earthworms play a key role in soil balance, influencing biodiversity and biogeochemical processes. This study analyzes how the presence of earthworms and biochar affects soil enzymatic activity. Using a

mesocosm with four treatments (control soil, soil with biochar, soil with earthworms, and soil with both), ten enzymes important for environmental and agronomic quality were evaluated. The results indicated that the combination of biochar and earthworms significantly increased the activity of protease and glucosidase enzymes, enhancing organic matter decomposition and nutrient availability. The discussion highlights that biochar, with its beneficial properties such as high recalcitrance and alkaline pH, can complement the positive effects of earthworms, although the biological interactions are still poorly understood. This study shows that the combined use of earthworms and biochar could be an effective strategy to improve soil quality.

INTRODUCCIÓN

Los suelos cumplen una función primordial para satisfacer las necesidades humanas y ecosistémicas. Los servicios que proporciona están directamente relacionados con el bienestar humano, alcanzando dimensiones sociales, ecológicas, económicas, culturales y espirituales (Li *et al.*, 2023). Existen diversos factores humanos y naturales que provocan diferentes procesos erosivos en el suelo. Algunos de estos son la compactación, acidificación, salinización, pérdida de carbono orgánico y diversidad, generando la pérdida de su capacidad de proveer servicios ecosistémicos, como alimentos y agua limpia, amenazando la estabilidad de los precios y el acceso a alimentos, desencadenando un aumento de la inseguridad alimentaria y la pobreza de millones de personas alrededor del mundo (IPCC, 2019). Para que el suelo pueda cumplir sus funciones debe presentar un correcto equilibrio entre las diversas especies de la cadena trófica que lo habitan, permitiendo un adecuado funcionamiento del ciclo biogeoquímico (Lazarova *et al.*, 2021). Las lombrices son un gran promotor de la biodiversidad del suelo y su salud, siendo los invertebrados más importantes en el proceso de descomposición y reciclaje de la materia orgánica (Edwards y Arancon, 2022; Wang *et al.*, 2022), poseen la capacidad de modificar características físicas (estructura de los agregados y la porosidad), químicas (ciclo de nutrientes) y biológicas del suelo (Edwards, 2004; Wang *et al.*, 2022). Respecto a los efectos que presentan las

lombrices sobre las características biológicas del suelo, se ha demostrado que impactan directamente en la distribución, diversidad y cantidad de microorganismos, dado que, las exudaciones de las lombrices quedan alojadas en las paredes de las madrigueras, siendo un ambiente propicio para el desarrollo de microbios al igual que las deposiciones, que son considerados “hotspot” debido a su alto contenido de carbono y por lo general presentan mayor actividad enzimática que el suelo circundante. Esto aumenta la actividad enzimática celular y extracelular en el suelo, lo que en la mayoría de los casos provoca un aumento de los nutrientes disponibles y mejor calidad del suelo (Blouin *et al.*, 2013; Lemtiri *et al.*, 2014; Jouni *et al.*, 2023).

El biocarbón podría ser utilizado como una estrategia complementaria a los efectos que posee la lombriz sobre la biología del hábitat. Este material muestra cualidades diferenciadoras con respecto a los carbones minerales, ya que, presenta una menor relación O/C dado que se produce a través de procesos de pirólisis de biomasa en condiciones anaerobias que superan los 300 °C de temperatura y pueden alcanzar hasta 700°C. Es además altamente recalcitrante (resiste oxidaciones químicas y biológicas) por lo que puede permanecer durante muchos años en el suelo sin moverse y presenta pH normalmente alcalino (Lehmann *et al.*, 2006). Se han demostrado numerosas ventajas que este puede entregar al suelo dependiendo de la materia prima y el procedimiento utilizado, como mejorar la fertilidad, la estructura de los poros, la estabilización del pH, mejorar la capacidad de intercambio catiónico, entre otras cualidades fisicoquímicas benéficas, pero poco se sabe sobre las interacciones o la influencia que pueden presentar los factores biológicos sobre las partículas de biocarbón (Escalante *et al.*, 2016; Sánchez-Hernández *et al.*, 2019).

Algunos biocarbones pueden adsorber diferentes tipos de compuestos dada su gran superficie específica, tales como compuestos tóxicos o enzimas extracelulares producidas por organismos o microorganismos. Cuando el biocarbón se encuentra con alto contenido enzimático y con una gran carga bacteriana entonces se dice que es un carbón activado, pero para que esto ocurra dependerá de factores como el tipo de biomasa utilizado como materia prima, duración de la incubación del biocarbón en el suelo, tipos de enzimas y el tipo de

suelo (Sharma *et al.*, 2023)

Es por esto que el presente estudio busca comprender los efectos que tiene la interacción de las lombrices y biocarbón sobre parámetros biológicos del suelo, en particular sobre enzimas de importancia ambiental y agronómica, contribuyendo a la implementación de estrategias que permitan remediar y/o mejorar la calidad de los suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Consiste en un mesocosmos de 4 tratamientos incubados durante 4 semanas en macetas ubicadas a campo abierto en la Estación Experimental El Nogal de la Universidad de Concepción, campus Chillán, región de Ñuble, Chile. Los tratamientos están individualizados en la Tabla 1, siendo todos los tratamientos realizados con 3 repeticiones.

Tabla 1. Diseño experimental del ensayo.

Tratamiento	Sigla	Descripción
Suelo control	C	Suelo
Suelo con biocarbon	B	Suelo + 1% biocarbón
Suelo con lombrices	L	Suelo + 30 lombrices
Suelo con biocarbón y lombrices	B+L	Suelo + 1% biocarbón + 30 lombrices

Caracterización de suelo

Suelo correspondiente al orden Andisol de la serie Arrayán, derivado de cenizas volcánicas modernas, de textura franco-arcillosa. Su clasificación pertenece a Medial, amorphic, thermic Humic Haploxerands (Stolpe, 2006). Suelo recolectado en la Estación Experimental El Nogal de la Universidad de Concepción, campus Chillán (36°35'52.6"S 72°04'55.0"W). Presenta un pH de 6,38, materia orgánica de 6,05%, suma de bases de 14,5 cmol Kg⁻¹, el contenido de nitrógeno (N) disponible es de 9,8 cmol Kg⁻¹, fósforo (P) intercambiable de 34,6 cmol Kg⁻¹ y potasio (K) intercambiable de 1,9 cmol Kg⁻¹. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de Concepción de acuerdo con la

metodología para suelos de Sadzawka *et al.* (2006).

Caracterización del biocarbón

Elaborado a partir de acículas de pino recolectadas de predios forestales de la región de Ñuble y Biobío, pirolizadas a 600 °C durante 90 minutos en una mufla marca Nabertherm LE/11/R7 en el Laboratorio de Materiales Carbonosos, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

pH

La medición del pH se llevó a cabo siguiendo el protocolo TMECC04.111, basado en métodos de ensayo para compost. Este protocolo utiliza el método electrométrico para determinar el pH en materiales sólidos (Sadzawka R. A *et al.*, 2005)

Conductividad eléctrica

La determinación se llevó a cabo según Sadzawka *et al.* (2005). En este método, la muestra tamizada y húmeda se mezcla con agua en una proporción 1:5. La suspensión resultante se centrifuga y la conductividad eléctrica se mide en el extracto.

Material volátil

La determinación de material volátil se realizó mediante el protocolo UNE-EN ISO 18123 aplicable para biocombustibles sólidos, en el cual una muestra de 0,1 g del tratamiento es sometida en un horno a una temperatura de 900° durante 7 minutos y posteriormente mediante cálculos entre la diferencia de su soporte frío y caliente, más la diferencia de peso de antes y después del golpe térmico, se calcula el porcentaje (AENOR, 2016).

Contenido de cenizas

Se realizó utilizando el protocolo UNE-EN ISO 18122 de abril de 2016, aplicable a pellets de biomasa forestal y madera. Este procedimiento implica realizar determinaciones duplicadas en un corto periodo de tiempo en el mismo laboratorio. Se coloca 1 g de muestra en un plato previamente tratado a 500°C durante 60 minutos, registrando sus pesos antes y después del tratamiento. La muestra y el plato se colocan en un horno, donde la temperatura se incrementa de 250°C a 550°C y se mantiene a esta última temperatura durante 60 minutos. Luego, se registran los pesos y se calcula el contenido de cenizas (AENOR, 2015).

Carbono, hidrógeno y nitrógeno

La determinación elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno fue realizada en un equipo analizador elemental marca Leco CHN 628, siguiendo protocolo del manual del equipo para medición en muestras sólidas y utilizando método Leco para la determinación carbono, hidrógeno y nitrógeno en biomasa y carbones. La curva de calibración fue realizada con un material de referencia certificado EDTA y COAL. Cada muestra fue analizada por triplicado.

Lombrices

Las lombrices utilizadas en este experimento corresponden a individuos adultos con clitelo desarrollado de la especie *Aporrectodea caliginosa* (Savigny), fueron recolectadas 200 unidades a mano y almacenadas en una caja de 1 m³ llena del mismo suelo de donde se extrajeron dos semanas antes del establecimiento del ensayo en las dependencias de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, y fueron identificadas usando las claves taxonómicas descritas por Hendrix (1995). Esta especie tiene una gran incidencia sobre la actividad microbiana y enzimática del suelo dado que es una lombriz endógena y una de las más habituales en suelos agrícolas (Lipiec *et al.*, 2016). Los huevos fueron identificados usando las claves taxonómicas descritas por Sims y Gerard (1985), donde se hace mención al aspecto blanco o amarillo opaco, con un tamaño de entre 2 y 4 mm fueron y formas semi ovaladas.

Establecimiento de ensayo

Se realizó un ensayo experimental en mesocosmos para 4 tratamientos (Tabla 1; C, B, L y B+L) con 3 repeticiones cada uno en macetas plásticas con capacidad de 6 L, previamente agujereadas (0,3 mm de diámetro) en el fondo para evitar anegamiento de agua. Cada maceta contenía 3 Kg de suelo previamente tamizado a 2 mm. Se le depositó en la superficie una dosis de 1% (p/p) de biocarbón para los tratamientos B y B+L, 30 lombrices adultas de la especie *Aporrectodea caliginosa* fueron adicionadas a los tratamientos L y B+L. Las lombrices habían sido previamente colectadas a mano desde el mismo sitio experimental a 20 cm de profundidad y fueron mantenidas en suelo húmedo en oscuridad a 20 °C durante 2 semanas hasta su uso. En el sitio experimental, se dispusieron las macetas con sus

respectivos tratamientos en una superficie de 12 m², enterrándolas de manera que quedaran 20 cm de borde expuesto sobre la superficie. De la superficie contigua a cada maceta, se extrajo una lámina de 1 cm de profundidad con vegetación (pradera natural) para cubrir el suelo superficial de cada maceta. Los tratamientos fueron incubados en campo por 4 semanas. Durante este período de incubación en Chillán, se registraron 112 mm de precipitaciones, con temperaturas promedio de 14,2 °C para las máximas y 5,4 °C para las mínimas.

Número de lombrices

Al finalizar el período de incubación se realizó el conteo de individuos adultos, juveniles y huevos, vertiendo 100 g del contenido de la maceta en una bandeja y manualmente se retiraron las lombrices y huevos encontrados depositándolos en placas Petri.

Materia orgánica

Se analizó de acuerdo con el protocolo descrito por Sadzawka *et al.* (2006). La muestra se secó en una estufa a 105 °C durante 2 horas. Tras este secado, se calentó en una mufla a 550 °C manteniéndola durante 2 horas y luego se dejó enfriar en un desecador hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó nuevamente. Con los datos registrados se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ec. 1).

$$\text{Materia orgánica (\%)} = 100 \times (A-B/A-C) \times F_{h_{\text{suelo}}} \text{ (Ec. 1)}$$

Donde A es la masa del suelo seco a 40 °C más el recipiente, B es la masa del residuo de calcinación más el recipiente, C es la masa del recipiente, y $F_{h_{\text{suelo}}}$ es el factor de corrección por humedad.

Carbono total

Se utilizó el protocolo descrito por Nelson y Sommers, (2018). Las muestras fueron acondicionadas previo a la lectura en el equipo, secándolas a temperatura ambiente, posteriormente, trituradas en mortero y tamizadas a 2 mm. Luego, se introdujeron las muestras en tubos Eppendorf a un equipo de análisis Dumas por combustión seca marca Leco Truspec micro para obtener los datos de carbono total.

Respiración microbiana del suelo

Después de la incubación en campo, se introdujeron 25 g de muestra de suelo de cada unidad experimental, se acondicionaron al 60 % del espacio poroso lleno de

agua (WFPS, por sus siglas en inglés) en tubos Falcon de 50 mL con tapones con septo de goma para muestreo de gas. Las emisiones de CO₂ se analizaron mediante espectroscopía infrarroja utilizando un analizador de gas CO₂ (Li-820, LI-COR Bioscience, Shelton, CT, EE. UU.) los días 1, 3, 5 y 7. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un modelo de interpolación lineal definido por la ecuación: $y = \alpha x + \beta$. En la ecuación y representa las emisiones por día, x representa a los días, α es la razón de cambio entre dos periodos de tiempo consecutivos y β corresponde a la intersección. La emisión total de gas (flujo acumulado) se obtuvo a partir de la suma de las emisiones de dos fechas consecutivas desde el día 1 hasta el día 7.

Actividad enzimática

De las muestras de suelo sometidas a incubación, se extrajeron al final del período muestras de suelo que fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis, determinándose las siguientes enzimas:

Carboxilesterasa. Se midió en suspensiones de agua-suelo mediante la incubación de alícuotas (200 μ L) durante 15 minutos (a 20 °C y en la oscuridad) en tubos Eppendorf® de 1,5 mL que contenían 375 μ L de un buffer de Tris-HCl 0,1 M (pH > 8,0) y 20 μ L de 4-nitrofenil butirato (2 mM, concentración final). La reacción se detuvo agregando 250 μ L de una solución que contenía 2 % (p/v) de laurilsulfato sódico y 2 % (p/v) de tris (hidroximetil) aminometano. Los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 1 minuto, y los sobrenadantes (250 μ L) se vertieron en placas microplates planas de 96 pozos. La absorbancia se leyó a 405 nm utilizando un lector de placas microplates BioTek® (BioTek Instruments, Inc., Highland Park, Winooski, VT, EE. UU.). La actividad enzimática se expresó en μ mol de nitrofenolato formado por hora y gramo de suelo seco. Para corregir la adsorción del producto de reacción a las partículas de suelo se construyeron curvas de calibración con concentraciones en serie de 4-nitrofenol, que se añadieron a tubos Eppendorf® que contenían buffer Tris y suelo. Por último, se tomaron medidas enzimáticas de cada muestra en tres repeticiones, y se ajustó la absorción de la muestra teniendo en cuenta la absorción de fondo generada por el control que no contenía sustrato (Sánchez-Hernandez *et al.*, 2021).

Catalasa. Se determinó a partir del método de Trasar-Cepeda *et al.* (1999). Se

prepararon suspensiones de suelo-agua mezclando 0,5 g de suelo húmedo con 8 mL de agua destilada por 30 minutos en un mezclador rotativo. Luego la reacción se inició agregando 1 mL de H₂O₂ al 0,3 % (p/v), y los tubos se incubaron por 15 minutos a una temperatura de 20 °C aproximadamente. La reacción se detuvo agregando 1 mL de H₂SO₄ al 3 M. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 4.500 x g durante 10 minutos a 10 °C, y el H₂O₂ residual se sometió a descomposición con una solución que contenía 110 mM de tampón de fosfato de sodio (pH = 7,4), 30 mM de 4-aminoantipirina, 5,3 % de fenol y 1,2 U mL⁻¹ de peroxidasa tipo-I de rábano picante (5 KU, Sigma-Aldrich, Madrid). El producto coloreado se leyó a 505 nm, y la actividad de la catalasa se expresó en µmoles (Sánchez-Hernandez *et al.*, 2017).

Deshidrogenasa. Se midió de acuerdo con el método desarrollado por von Mersi y Schinner, (1991), utilizando cloruro de idonitrotetrazolio como aceptor de electrones. La formación de formazán de idonitrotetrazolio reducido (INTF) se determinó espectrofotométricamente luego de una reacción durante 60 minutos a 40 °C, y los resultados se expresaron como µmoles de INTF por hora y gramo de suelo seco (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2017).

Fosfatasa ácida. Se realizó siguiendo el método de Popova y Deng, (2010) en un medio de reacción que contenía 100 µL de suspensión suelo-agua, 100 µL de agua destilada y 50 µl de los sustratos respectivos (fosfato de 4-nitrofenilo o 4-nitrofenil β-D-glucanopiranosido; 5 mM de concentración final) previamente fueron disueltos en un tampón universal modificado de 20 mM (pH = 6,5). Después de una agitación continua durante 4 horas a 20 °C aproximadamente, las microplacas se centrifugaron (2.500 x g, 10 °C y 10 minutos), y se transfirieron 150 µL de sobrenadante a microplacas nuevas. El 4-nitrofenol formado se leyó inmediatamente (< 1 min) a 405 nm después de la adición de 75 µL de NaOH 0,5 M a los pocillos. Se realizaron curvas de calibración estándar con 4-nitrofenol (5 – 100 nmol mL⁻¹) para fines de referencia (Sánchez-Hernandez *et al.*, 2017).

Fosfodiesterasa. Se utilizó el procedimiento descrito por Acosta-Martínez y Tabatabai (2011). Se vertió 1 g de suelo tamizado (≤ 2 mm) en un matraz Erlenmeyer de 25 mL y se añadió 2 mL de tolueno, 4 mL de tampón THAM a pH

igual a 8,0 y 1 mL de solución BPNP. Se agita para mezclar, posteriormente se tapó y se incubó a 37 °C. Luego de 1 hora se retiró el tampón y se añadió a la solución 1 mL CaCl_2 0,5 M y 4 mL de solución extractante THAM-NaOH (pH = 12). Se agitó nuevamente y se filtró la suspensión a través de papel filtro Whatman No. 2. Se midió la intensidad de color amarillo con espectrofotometría de 400 a 410 nm. Se calculó el contenido de p-nitrofenol de acuerdo a su grafica de calibración.

β -Glucosaminidasa. Fue determinado de acuerdo al método descrito por Deng y Popova, (2011). Se Introdujo 1 mL de suelo tamizado (< 2 mm) en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se añadió 0,2 mL de tolueno, se mezcló y se dejó reposar 15 min bajo una campana de extracción. Posteriormente se agregó 4 mL de tampón MUB a pH igual a 6,0 y 1 mL de solución PNG, luego se tapó el matraz para mezclar y se incubó a 37 °C. Pasada 1 hora se añadió 1 mL de CaCl_2 0,5 M y 4 mL de tampón THAM 0,1 M (pH = 12) y se mezcló para luego filtrar la suspensión de suelo con papel filtro Whatman No. 2V. Se midió la intensidad de amarillo con espectrofotometría a 405 nm y se calculó la cantidad de p-nitrofenol liberado de acuerdo a la curva de calibración.

Proteasa. Se midió según el método descrito por Schinner *et al.* (1996), pero en el caso de este estudio las reacciones se realizaron utilizando tubos de microcentrifuga de 1,5 mL para reducir el consumo de reactivos. La mezcla de reacción consistía en 0,5 mL de suspensión suelo-agua y 0,5 mL de caseína al 2 % en peso disuelta en un tampón Tris-HCl de 50 mM (pH = 8,1). Las muestras fueron agitadas de manera continua durante 4 horas en un baño de agua a 50 °C y posteriormente el exceso de proteínas se precipitó mediante la adición de ácido tricloroacético frío al 0,92 M, seguido de una centrifugación (10.000 x g, 20 minutos, 4 °C). Se añadieron alícuotas (80 μL) de los sobrenadantes a pozos de placas microplates y los aminoácidos aromáticos formados se detectaron mediante la adición de 120 μL de una solución alcalina (50:1:1, v/v, 0,47 M de Na_2CO_3 que contenía 6 mM de NaOH, 20 mM de CuSO_4 , 26 mM de tartrato sódico potásico) seguida de 80 μL de 10 % (v/v) de reactivo fenol Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, Madrid). Las placas microplates se conservaron en oscuridad durante 90 minutos hasta que se completó el desarrollo del color, y el complejo azul se leyó a 700 nm.

La tirosina (Sigma-Aldrich®, Madrid) se utilizó como estándar, y la actividad de la proteasa se expresó en μ moles de equivalentes de tirosina por hora y gramo de suelo seco (Sánchez-Hernandez *et al.*, 2017).

β -glucosidasa. Se preparó la suspensión de suelo agregando 5 gr de suelo y 0,5 mL a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se dejó reposar 15 minutos bajo una campana extractora de gases. Posteriormente se agregan 20 mL de una solución de quitina (1,5 gramos de quitina purificada en 100 mL de un tampón de fosfato recién preparado). Se incubó a 37 °C y se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 μ m. Luego se transfirió 0,5 mL del filtrado a un tubo de ensayo de 15 mL y se realizó ajuste a 2 mL con agua destilada. Seguido a esto, se agregó 0,4 mL de tampón de borato (0,8 M, pH 9,1) y se mezcló. El tubo se puso en un baño de agua hirviendo hasta el nivel del líquido durante 3 minutos. Al retirarlo se enfrió con agua fría hasta que la solución alcanzó la temperatura ambiente (21 – 23 °C). Después, se agregó 5 mL de una solución de reactivo DMAB al tubo de ensayo y se agitó. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Luego se enfrió en agua helada inmediatamente finalizada la incubación. Se tomó una alícuota del sobrenadante y para medir la absorbancia a 590 nm en relación con agua destilada.

DESARROLLO Y DISCUSIÓN

Características físicas y químicas del biocarbón. La Tabla 2 muestra las características del biocarbón utilizado en este estudio. Destacando un pH cercano a neutro y con un contenido de C total de 75,9%, lo cual concuerda con la clasificación de biocarbon básico/standard indicado por European Biochar Certification (Lehmann y Joseph, 2015).

El número inicial de lombrices de 30 adultas y sin individuos juveniles ni huevos; sin embargo, al final de las 4 semanas se evidencia actividad reproductiva, ya que hay presencia de huevos y lombrices juveniles. El tratamiento L tuvo una pérdida de 6 lombrices adultas y un aumento de 0,67 lombrices juveniles y 13 huevos resultantes de la actividad reproductiva. En el tratamiento B+L se observó una pérdida de 3,7 lombrices adultas, un aumento de 1,7 lombrices juveniles y 24,3 huevos. La pérdida

de lombrices adultas puede estar relacionada al ciclo de vida de las lombrices, ya que la vida promedio de las lombrices es de 1 a 2 años (Edwards y Bohlen, 1996) y las usadas en este experimento fueron recolectadas en estado adulto desde el medio natural, desconociéndose su edad exacta.

Tabla 2. Características físicas y químicas del biocarbón.

Indicadores	Valor	D.E
pH	6,53	0,11
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	184,1	6,36
Material volátil (%)	17,83	0,31
Contenido de cenizas (%)	14,94	0,06
Carbono (%)	75,9	0,30
Nitrógeno (%)	1,27	0,01
Hidrógeno (%)	2,61	0,02

Número de lombrices. El número de individuos en diferentes estados de desarrollo se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de lombrices y huevos de *Aporrectodea caliginosa*.

Tratamiento	Estado	Inicial	Final \pm D.E
L	Huevos	0	13,0 \pm 4,0
	Juveniles	0	0,7 \pm 1,2
	Adultas	30	24,0 \pm 2,5
B+L	Huevos	0	24,3 \pm 3,5
	Juveniles	0	1,7 \pm 0,6
	Adultas	30	26,3 \pm 4,6

D.E.= desviación estándar de 3 repeticiones; análisis estadístico mediante Prueba LSD Fisher ($P \leq 0,05$)

Otra posibilidad es la competencia por sustrato entre individuos adultos en reproducción, situación que se ha observado en experimentos de mesocosmos abiertos (Lubbers y Van Groenigen, 2013).

El contenido de materia orgánica obtenido al final del experimento se aprecia en la Tabla 4. El tratamiento control evidenció un contenido significativamente mayor al de los tratamientos L y B+L, dado que, la presencia de lombrices endogeicas degrada la materia orgánica en el suelo despolimerizando compuestos complejos y convirtiéndolos en compuestos más simples disponibles para los microorganismos (Dominguez *et al.*, 2021).

Tabla 4. Contenido de materia orgánica (MO) y carbono total (CT) del suelo sometido a diferentes tratamientos.

Tratamiento	MO (%)	CT (%)
C	5,98 a	3,43 b
B	5,44 ab	3,93 ab
L	5,31 b	3,53 ab
B+L	4,89 b	4,08 a

D.E.= desviación estándar de 3 repeticiones; C.V.= coeficiente de variación; Prueba LSD Fisher ($P \leq 0.05$).

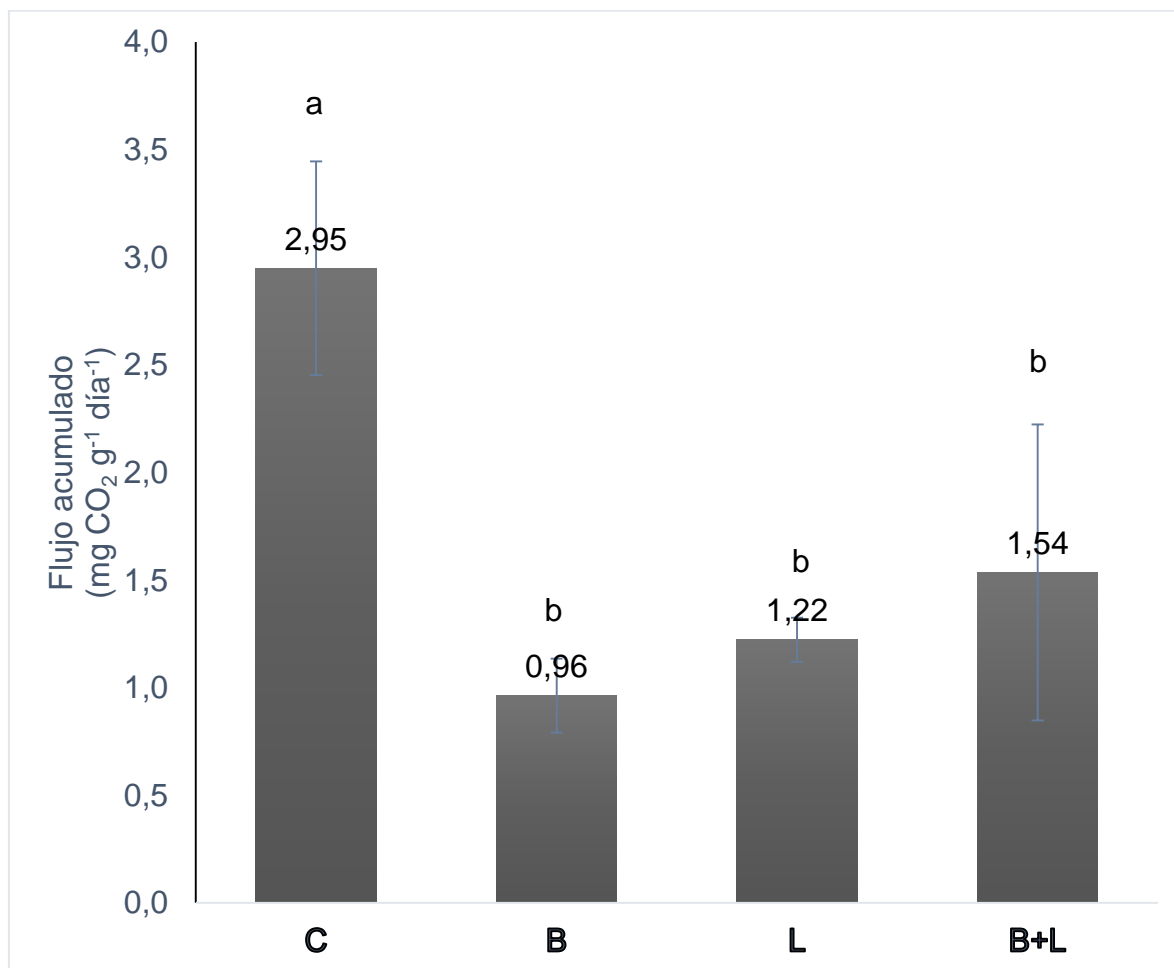
La Figura 1 representa la cantidad de respiración acumulada a los 7 días. Los valores de las medias obtenidas para cada tratamiento fueron; 2,95; 0,96; 1,22 y 1,54 mg CO₂ g⁻¹ día⁻¹ para C, B, L y B+L respectivamente. Se observa que el tratamiento control es significativamente superior a los otros tres tratamientos. El promedio obtenido entre las medias de los tratamientos B, L y B+L fue de 1,24 mg CO₂ g⁻¹ día⁻¹, esto es 58% menor a la media obtenida en el tratamiento control.

En la mayoría de los casos previamente reportados (Edwards y Arancon, 2022; Dominguez *et al.*, 2021), las lombrices aumentan la respiración de los microorganismos del suelos, debido a que la actividad digestiva del tracto de las lombrices estimula el proceso de mineralización aumentando la cantidad y actividad de los microorganismos en el suelo desde el tracto digestivo de las lombrices y en las deposiciones, pero en este estudio el efecto corresponde a una disminución de la respiración en los tratamientos.

En L y B+L puede atribuirse a que son los tratamientos que presentaron el menor contenido de materia orgánica al momento de las mediciones de respiración tal

como se presenta en la Tabla 4, por el consumo previo de la materia orgánica durante la incubación; siendo ratificado en que el tratamiento B+L se registró el mayor aumento de lombrices (Tabla 3).

Figura 1. Respiración acumulada de suelo sometido a diferentes tratamientos.



LSD Fisher ($P \leq 0,05$)

Otro efecto, puede ser atribuido a que las partículas de biocarbones producidos en base a materia lignocelulosa a una temperatura de 600 °C poseen un alto contenido de microporosidad que le otorga al material la capacidad de capturar y fijar moléculas de CO₂ al interior de su red porosa o formando enlaces con los grupos orgánicos que se encuentran en la superficie de contacto, disminuyendo el contenido de gases emitidos por los microorganismos y aumentando la fijación de carbono en el suelo (Ghani *et al.*, 2013; Dissanayake *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2023);

siendo evidenciado en el tratamiento B que no contenía lombrices y la respiración de suelo obtenida fue la menor entre todos los tratamientos.

Respecto al contenido de C total (Tabla 4) de los suelos al final del período de incubación. Esto comprende desde carbono lábil hasta el recalcitrante. El contenido C total en el tratamiento control presenta una media de 3,43 % es estadísticamente inferior al tratamiento B+L que presenta una media de 4,08 %. Esto tiene relación con la capacidad que tiene *Aporrectodea caliginosa* de aumentar el número de microorganismos a partir de su mucosa digestiva y las deposiciones (Lipiec *et al.*, 2016; Edwards y Arancon, 2022), por otro lado, el biocarbón funciona como un hábitat óptimo para estos microorganismos que descomponen el carbono orgánico en formas de carbono más estables, permitiendo de esta manera, aumentar el contenido de carbono total en el (Lin *et al.*, 2023). Además, en el caso de los tratamientos B y B+L, existe una segunda fuente de carbono no proveniente de la descomposición de la materia orgánica, sino del biocarbón incorporado, que posee un contenido aproximado de 75.9 % de carbono recalcitrante en su estructura.

Tabla 5. Contenido de N mineral en el suelo al finalizar el período de incubación.

Tratamientos	NO ₃ (mg Kg suelo ⁻¹)	NH ₄ (mg Kg suelo ⁻¹)	N total (mg Kg suelo ⁻¹)
C	1,80 c	7,97 ab	9,77 b
B	6,30 b	5,83 ab	12,23 b
L	20,33 a	9,13 a	29,42 a
B+L	4,30 bc	4,97 b	9,25 b

Prueba LSD Fisher ($P \leq 0.05$)

En la Tabla 5 se observan los contenidos de las fracciones minerales y total de N. Todos los tratamientos tienen un contenido de N total significativamente inferior al tratamiento L. El aumento significativo registrado en el tratamiento L es producto de la actividad digestiva de las lombrices, que al estimular la actividad microbiana provoca un aumento de la mineralización del N del suelo (Dominguez *et al.*, 2021).

La Tabla 6 muestra los valores medios de las diferentes actividades enzimáticas que no presentaron cambios significativos en respuesta a los tratamientos.

Tabla 6. Actividad enzimática carboxilesteresasa, catalasa, fosfatasa ácida, fosfodiesterasa, β -glucosaminidasa de los suelos sometidos a los tratamientos.

Enzimas	Unidad	C	B	L	BL
Carboxilesterasa	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$	1,88	2,13	1,62	1,85
Catalasa	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$	8,15	7,92	8,91	7,23
Fosfatasa ácida	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$	4,15	3,46	3,37	3,38
Fosfodiesterasa	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$	0,96	1,17	1,18	1,28
β -glucosaminidasa	$\text{nmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$	199,27	299,56	268,05	268,69

Resultados sin diferencia estadística según LSD Fisher ($p \leq 0,05$); comparación es realizada entre tratamientos por cada enzima.

En la Figura 2 se observa que la deshidrogenasa disminuyó en todos los tratamientos en comparación al control, siendo en promedio inferior en un 23,6% en el caso del tratamiento B en comparación con el control. Esta disminución da cuenta de menor actividad de microorganismos a nivel general en ese suelo, esto es debido a que el biocarbón es un material recalcitrante que no aporta C como fuente de energía para el metabolismo microbiano, y a su vez, en este tratamiento tuvo una menor disponibilidad de N mineral (Tabla 5) que es esencial para el metabolismo energético de los microorganismos del suelo (Pati y Sahu, 2004; Liu *et al.*, 2018).

Figura 2. Actividad deshidrogenasa en suelo sometido a diferentes tratamientos.

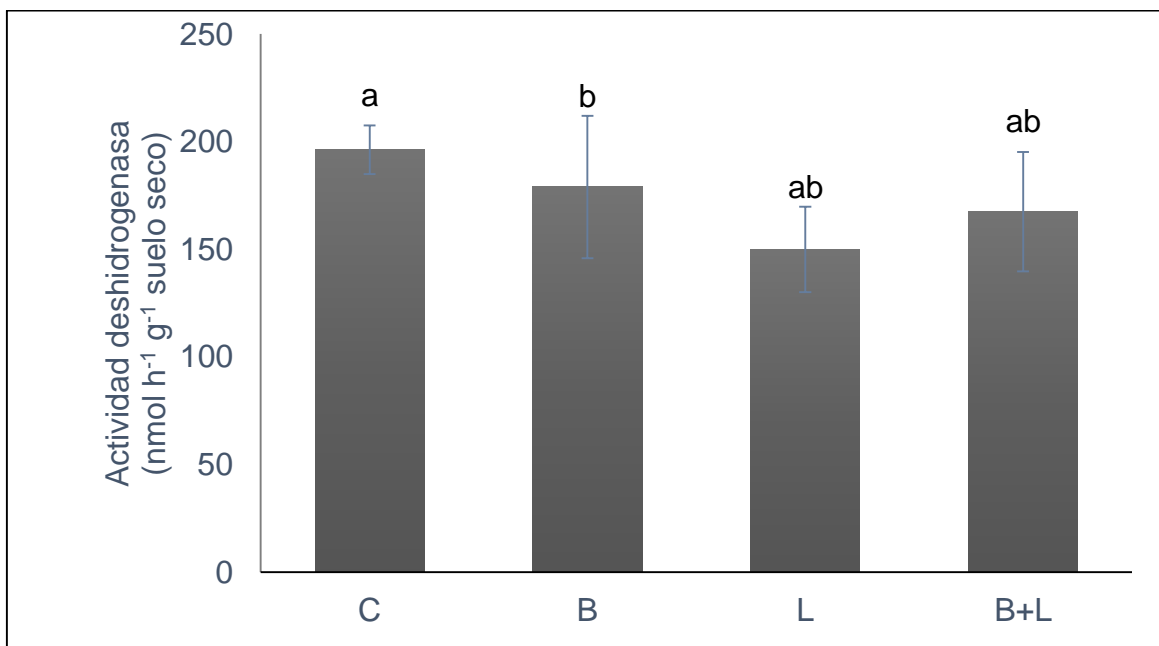
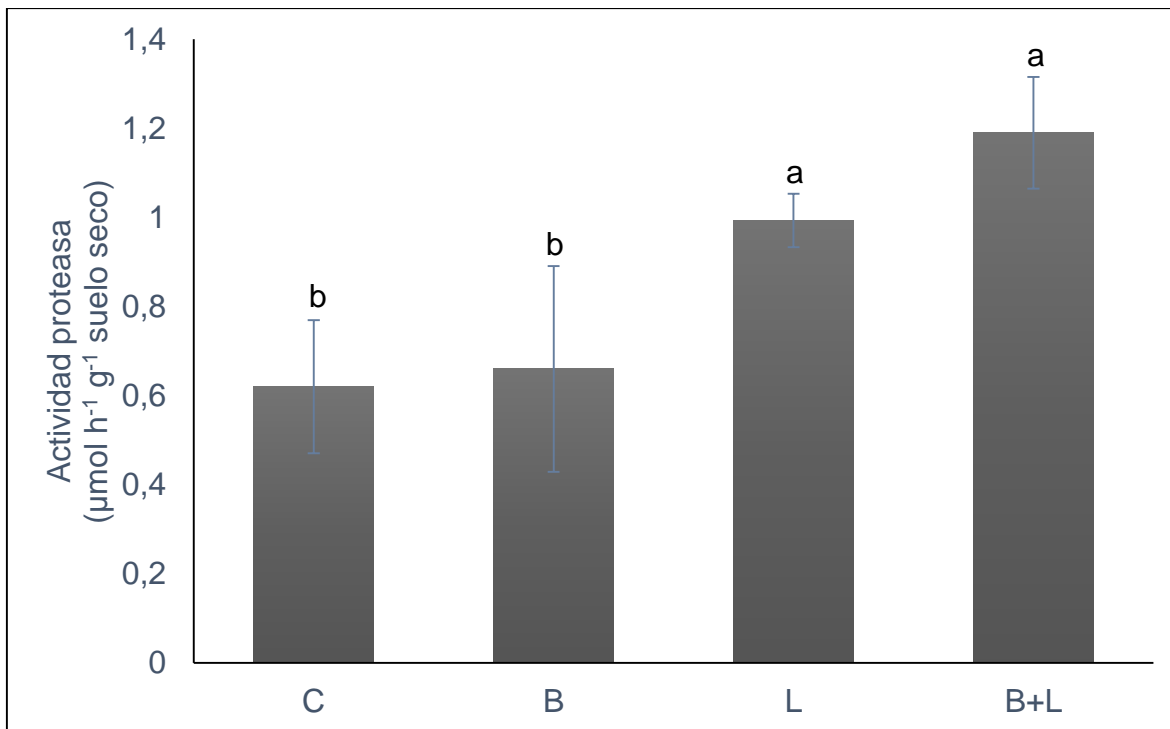
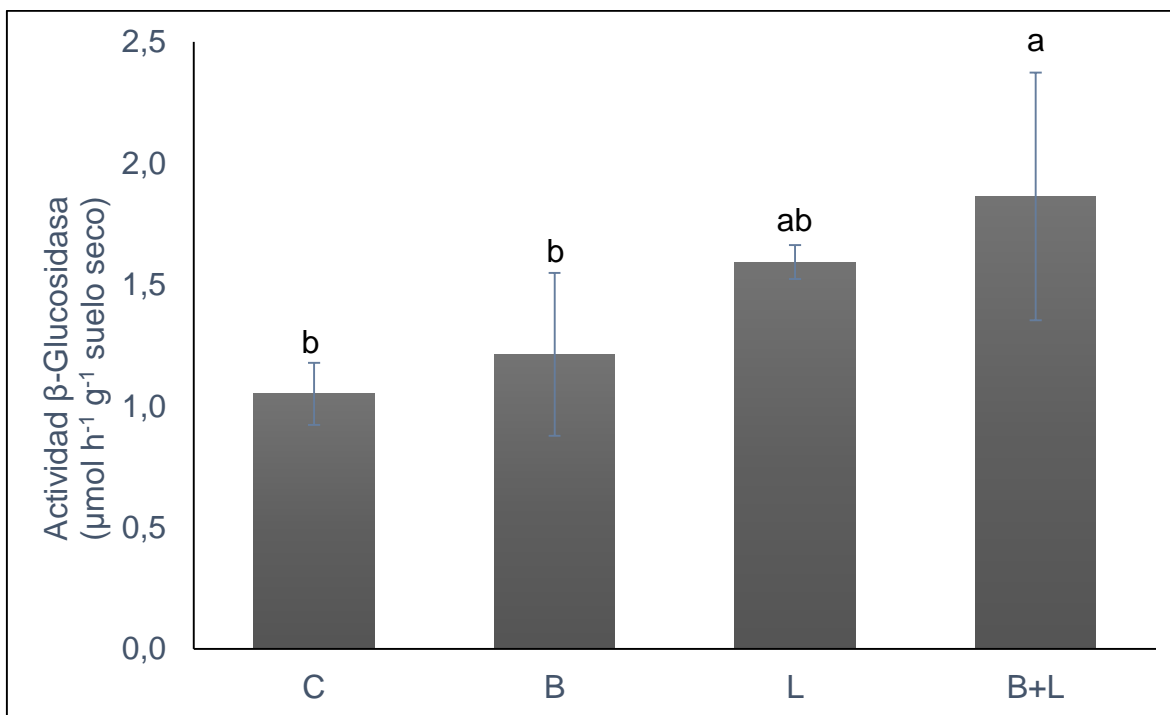


Figura 3. Actividad proteasa en suelo sometido a diferentes tratamientos.

Figura 4. Actividad β -Glucosidasa

La Figura 3 muestra un aumento de un 59,68% de la actividad proteasa en el

tratamiento L y de 91,94% en el tratamiento B+L en comparación al control. Esto ocurre porque dentro del tracto digestivo de las lombrices la enzima proteasa permite romper los enlaces peptídicos de la materia orgánica de la cual se alimentan y posteriormente en las deyecciones, existiendo así un alto contenido de esta enzima en los suelos con lombrices (Pati y Sahu, 2004; Aira *et al.*, 2005). Por este motivo es que en los tratamientos L y B+L se registró mayor degradación del contenido de materia orgánica como señala la Tabla 4.

En el caso de la β -glucosidasa (Figura 4) el tratamiento B+L es significativamente mayor a los tratamientos C y B (77,14% 53,72% respectivamente). Esta enzima es responsable de la degradación de los carbohidratos complejos de la materia orgánica ingerida por las lombrices transformándolos en carbohidratos más simples que sirve de sustrato para los microorganismos del suelo y de la flora intestinal de las lombrices. Es por ello, que se registran aumentos en B+L, lo que permitió mayor degradación de la materia orgánica y estimulación de la actividad β -glucosidasa (Dominguez *et al.*, 2021). Además, esto se podría atribuir a que la acción digestiva de *A. caliginosa*, en presencia de biocarbón, puede propiciar un ambiente óptimo de contacto sobre la superficie y la red porosa del biocarbón, lo cual podría potenciar el desarrollo de microorganismos y almacenamiento de compuestos orgánicos que pueden mantenerse en constante interacción, permitiendo que la actividad enzimática aumente o se mantenga en el tiempo (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

1. El efecto simultaneo de *Aporrectodea caliginosa* y el biocarbón de acícula de pino benefician la actividad de las enzimas proteasa y glucosidasa en suelo Arrayán; sin presentar efecto en las otras enzimas evaluadas.
2. *Aporrectodea caliginosa* promueve un mayor contenido de N mineral y C total en los suelos.
3. *Aporrectodea caliginosa* y biocarbón de pino disminuyen las emisiones de dióxido de carbono del suelo.

REFERENCIAS

1. Acosta-Martínez, V and Tabatabai, M. A. 2011. Phosphorus cycle enzymes. En Soil Science Society of America book series (pp. 161-183).
2. Aira, M., Monroy, F and Domínguez, J. 2005. Ageing effects on nitrogen dynamics and enzyme activities in casts of *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). *Pedobiologia*, 49(5), 467-473.
3. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). 2016. Norma Internacional ISO 18123:2015. Biocombustibles sólidos. Determinación de material volátil. Subcomité 1 (CIEMAT). 15
4. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). 2015. Norma Internacional ISO 18123:2015. Biocombustibles sólidos. Determinación de contenido de cenizas. Subcomité 1 (CIEMAT). 12
5. Blouin, M., Hodson. M. E. Delgado, E., Baker, G., Brussaard, L. Butt, K. R and Brun, J. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.*, 64(2), 161-182.
6. Deng, S. and Popova, I. E. 2011. Carbohydrate hydrolases. En Soil Science Society of America book series (pp. 185-209).
7. Dissanayake, P. D., S. You, A. D. Igalavithana, Y. Xia, A. Bhatnagar, S. Gupta, D. C. W. Tsang, E. E. Kwon, K. H. Kim and Y. S. Ok. 2020. Biochar-based adsorbents for carbon dioxide capture: A critical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 119: 109582.
8. Dominguez, A., Gabbarini, L. A. Rodríguez, M. H., Escudero, H. J. Wall, L. G. and Bedano, J. C. 2021. Crop residues used as food drive enzyme activation and enzymatic stoichiometry in casts of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826). *Appl. Soil Ecol.*, 166, 104000.
9. Edwards, C. A. 2004. *Earthworm Ecology*. CRC Press eBooks.
10. Edwards, C. A and Arancon, N. Q. 2022. The role of earthworms in organic matter and nutrient cycles. En Springer eBooks (pp. 233-274).
11. Edwards, C. A and Bohlen, P. J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman and Hall.
12. Escalante, A., G. Pérez, C. Hidalgo, J. López, J. Campo, E. Valtierra, y J. D. Etchevers. 2016. Biocarbón (biochar) I: Naturaleza, historia, fabricación y uso en el suelo. *Terra Latinoamericana* 34(3): 367-382.
13. Ghani, W. A. W. A. K., A. B. Mohd, G. Da Silva, R. T. Bachmann, Y. H. Taufiq-Yap, U. Rashid and A. H. Al-Muhtaseb. 2013. Biochar production from waste rubber-wood-sawdust and its potential use in C sequestration: Chemical and

- physical characterization. *Ind. Crops Prod.* 44: 18-24.
14. Hendrix, P. F. 1995. *Earthworm Ecology and Biogeography in North America*. [Pág. 235].
 15. Shukla, P. R. Skea, J. Calvo Buendia, E. Masson-Delmotte, V. Pörtner, H.-O. Roberts, D. C. Zhai, P. Slade, R. Connors, S. van Diemen, R., Ferrat, M. Haughey, E. Luz, S. Neogi, S. Pathak, M. Petzold, J. Portugal Pereira, J. Vyas, P. Huntley, E. Kissick, K. Belkacemi, M. y Malley, J. 2019. El cambio climático y la tierra: Informe especial del IPCC sobre el cambio climático, la desertificación, la degradación de las tierras, la gestión sostenible de las tierras, la seguridad alimentaria y los flujos de gases de efecto invernadero en los ecosistemas terrestres. IPCC.
 16. Jouni, F., Sánchez-Hernández, J. C. Brouchoud, C. Capowiez, Y. and Rault, M. 2023. Role of soil texture and earthworm casts on the restoration of soil enzyme activities after exposure to an organophosphorus insecticide. *Appl Soil Ecol.*, 187, 104840.
 17. Lazarova, S., Coyne, D. Rodríguez, M. G. Peteira, B. and Ciancio, A. 2021. Functional Diversity of Soil Nematodes in Relation to the Impact of Agriculture A Review. *Diversity*, 13(2), 64.
 18. Lehmann, J., Gaunt, J. L. and Rondón, M. A. 2006. Bio-char sequestration in Terrestrial ecosystems – a review. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 11(2), 403-427.
 19. Lehmann, J., & Joseph, S. (Eds.). (2015). *Biochar for environmental management: Science, technology and implementation* (2nd ed.). Routledge.
 20. Lemtiri, A., Colinet, G. Alabi, T. Cluzeau, D. Zirbes, L. Haubruge, É. and Francis, F. 2014. Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. HAL (Le Centre pour la Communication Scientifique Directe).
 21. Li, T., Cui, L. Xu, Z. Liu, H. Cui, X. and Fantke, P. 2023. Micro- and Nanoplastics in soil: Linking sources to damage on soil ecosystem services in life cycle assessment. *Sci. Total Environ.*, 904, 166925.
 22. Lin, W., Chen, D. and Zhu, L. 2023. Biochar carbon sequestration potential rectification in soils: Synthesis effects of biochar on soil CO₂, CH₄ and N₂O emissions. *Sci. Total Environ.*, 904, 167047.
 23. Lipiec, J., Frąć, M. Brzezińska, M. Turski, M. and Oszust, K. 2016. Linking microbial enzymatic activities and functional diversity of soil around earthworm burrows and casts. *Front. Microbiol.*, 7.
 24. Liu, Q., Zhang, Y. Liu, B. Amonette, J. E. Lin, Z. Liu, G. and Xie, Z. 2018. How does biochar influence soil N cycle? A meta-analysis. *Plant Soil*, 426 (1-2),

211-225.

25. Lubbers, I. M and Van Groenigen, J. 2013. A simple and effective method to keep earthworms confined to open-top mesocosms. *Appl. Soil Ecol.*, 64, 190-193.
26. Nelson, D. W and Sommers, L. E. 2018. Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. En *Soil Science Society of America book series* (pp. 961-1010).
27. Pati, S. S and Sahu, S. K. 2004. CO₂ evolution and enzyme activities (dehydrogenase, protease and amylase) of fly ash amended soil in the presence and absence of earthworms (*Drawida willsi* Michaelsen) under laboratory conditions. *Geoderma*, 118(3-4), 289-301.
28. Popova, I. E and Deng, S. 2010. A high-throughput microplate assay for simultaneous colorimetric quantification of multiple enzyme activities in soil. *Appl. Soil Ecol.*, 45(3), 315-318.
29. Sadzawka, M.A.R., Carrasco, M.A. Demanet, F.R. Flores, P.H. Grez, Z.R. Mora, G.M.L. and Neaman, A. 2006. Recommended analysis methods for Chilean soils. Revisión 2006; INIA Serie Actas No. 34. Santiago, Chile: Imprenta Salesianos S.A.
30. Sadzawka R. A., M. A. Carrasco R., R. Grez Z. y M.L. Mora G. 2005. Métodos de análisis de compost. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas N° 30, Santiago, Chile, 142 p.
31. Sánchez-Hernández, J. C., Ro, K. S. and Díaz, F. J. 2019. Biochar and earthworms working in tandem: Research opportunities for soil bioremediation. *Sci. Total Environ.*, 688, 574–583.
32. Sánchez-Hernández, J. C., Ro, K. S. Szögi, A. A. Su, C. and Park, B. 2021. Earthworms increase the potential for enzymatic bio-activation of biochars made from co-pyrolyzing animal manures and plastic wastes. *J. Hazard Mater.*, 408, 124405.
33. Sánchez-Hernández, J. C., Sandoval, M. and Pierart, A. 2017. Short-term response of soil enzyme activities in a chlorpyrifos-treated mesocosm: use of enzyme-based indexes. *Ecol. Indic.*, 73, 525-535.
34. Sharma, A. K., Ghodke, P. K. Goyal, N. Bobde, P. Jung, S. Lin, K. A. y Chen, W. 2023. A critical review on biochar production from pine wastes, upgradation techniques, environmental sustainability, and challenges. *Bioresour. Technol.*, 387, 129632.
35. Schinner, F., Öhlinger, R. Kandeler, E. and Margesin, R. 1996. *Methods in soil biology*. Springer eBooks.

36. Stolpe, N.B. 2006. Descripciones de los principales suelos de la VIII Región de Chile. Publicaciones Departamento de Suelos and Recursos Naturales N°1. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
37. Sims, R. W. and Gerard, B. M. 1985. Earthworms: Keys and Notes for the Identification and Study of the Species. Brill Archive
38. Trasar-Cepeda, C., Camiña, F. Leirós, M. and Gil-Sotres, F. 1999. An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 31(3), 483-485.
39. Von Mersi, W. and Schinner, F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, 11(3), 216-220.
40. Wang, X., Gong, B. He, E. Peijnenburg, W. J. and Qiu, H. 2022. Subcellular localization and compartment-specific toxicokinetics of cadmium, arsenic, and zinc in brandling worm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 308, 136482.
41. Zhu, X., Chen, B. Zhu, L. and Xing, B. 2017. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. *Environ. Pollut.*, 227, 98-115.