

**Análisis de la actividad de la enzima Fenol oxidasa a lo largo de un gradiente de niveles de agua-suelo en un humedal de alta montaña del páramo de Belmira, Antioquia**

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniero Ambiental

**Daniela Velásquez Betancur**

**Asesor**  
**Jorge Andrés Villa Betancur**  
PhD. Ciencias Ambientales

**Corporación Universitaria Lasallista.**  
**Facultad de Ingenierías**  
**Ingeniería Ambiental**  
**Caldas Antioquia**  
**2018**

### **Nota de responsabilidad**

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

**Contenido**

<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>15</b>
<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>17</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivo específico</b> .....	<b>18</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>19</b>
<b>Área de estudio</b> .....	<b>19</b>
<b>Toma de Muestras</b> .....	<b>20</b>
<b>Procesamiento y análisis de muestras</b> .....	<b>22</b>
<b>Actividad enzimática</b> .....	<b>22</b>
<b>Compuestos Fenólicos</b> .....	<b>23</b>
<b>Análisis de la información</b> .....	<b>24</b>
<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>26</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>32</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>33</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>34</b>
<b>Apéndices</b> .....	<b>41</b>

**Lista de tablas**

Tabla 1. Descriptivos actividad enzimática.....	26
Tabla 2. Descriptivos Compuestos fenólicos.....	26

### Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático que muestra el papel del oxígeno en el control de la descomposición. ....	12
Figura 2. Área de estudio del Páramo de Belmira en los Andes tropicales centrales del norte.....	19
Figura 3. Estructura química del compuesto obtenido, Dopaquinona. ....	25
Figura 4. Actividad enzimática Vs concentración de compuestos fenólicos en la matriz de suelo y agua de poro en el humedal .....	28

**Lista de apéndices**

Apéndice A. Registro fotográfico .....	41
--	----

## Resumen

La enzima fenol oxidasa cumple un papel importante en el control de las tasas de descomposición de la materia orgánica en humedales tipo turbera, pero con el aumento en el gradiente de profundidad y por ende la ausencia de oxígeno, la actividad de la enzima se ve restringida por condiciones de anaerobiosis dando paso a una mayor acumulación de compuestos fenólicos en relación al nivel del agua y el contenido de materia orgánica. Para abordar los problemas del cambio climático a raíz de los índices de emisión o acumulación de gases de efecto invernadero, se requiere estimar los patrones que afectan de forma directa en los procesos de degradación y descomposición de la materia dentro del ecosistema. Por lo anterior, se planteó como objetivo de estudio analizar la actividad de la enzima fenol oxidasa y la concentración de compuestos fenólicos en un humedal de alta montaña del páramo de Belmira, Antioquia como una forma de conectar la actividad microbiana y la estructura del sitio con la tasa de descomposición de materia. Para ello se tomaron muestras de suelo y agua en un gradiente de niveles de inundación a diferentes profundidades con el fin de estimar la actividad enzimática en el complejo y el contenido de compuestos fenólicos ligado a dicha actividad. Los resultados revelan que la enzima describe una relación inversa con la profundidad. Por su parte la concentración de los compuestos fenólicos se ve aumentada a medida que las profundidades se hacen más grandes. Así la Enzima desempeña un papel fundamental en la descomposición de material vegetal y compuestos orgánicos en las zonas más superficiales del humedal de alta montaña, donde el nivel freático es menor a un metro. Por tanto es indispensable impulsar la

adopción de estrategias locales de mitigación y adaptación a su vez que planes de conservación en las zonas de humedal en paramo, para disminuir los efectos negativos sobre el sistema a causa de agentes antropogénicos, en concordancia con las políticas de ordenamiento a nivel nacional.

**Palabras clave:** Actividad Enzimática, Compuestos Fenólicos, Degradación, Páramo, Trópico.

### **Abstract**

The phenol oxidase enzyme has an important role in controlling the decomposition rates of organic matter in peatland wetlands, but with the increase in the depth gradient and therefore the absence of oxygen, the activity of the enzyme is restricted by anaerobic conditions giving way to a greater accumulation of phenolic compounds in relation to the water level and the content of organic matter. To address the problems of climate change as a result of emission or accumulation rates of greenhouse gases, it is necessary to estimate the patterns that directly affect the processes of degradation and decomposition of matter within the ecosystem. Therefore, the objective of the study was to analyze the activity of the enzyme phenol oxidase and the concentration of phenolic compounds in a high mountain wetland of the paramo of Belmira, Antioquia as a way to connect the microbial activity and the structure of the site with the rate of matter decomposition. To do this, samples of soil and water were taken in a gradient of flood levels at different depths in order to estimate the enzymatic activity in the complex and the content of phenolic compounds linked to the activity. The results reveal that the enzyme describes an inverse relationship with depth. For its part, the concentration of phenolic compounds is increased as the depths become larger. Thus the Enzyme plays a fundamental role in the decomposition of plant material and organic compounds in the most shallow areas of the high mountain wetland, where the Water sheet is less than one meter. Therefore, it is essential to promote the adoption of local mitigation and adaptation strategies in turn, as well as conservation plans in the wetland

areas in paramo, in order to reduce the negative effects on the system caused by anthropogenic agents, in accordance to national planning policies.

**Key words:** Enzymatic Activity, Phenolic Compounds, Degradation, Paramo, Tropics.

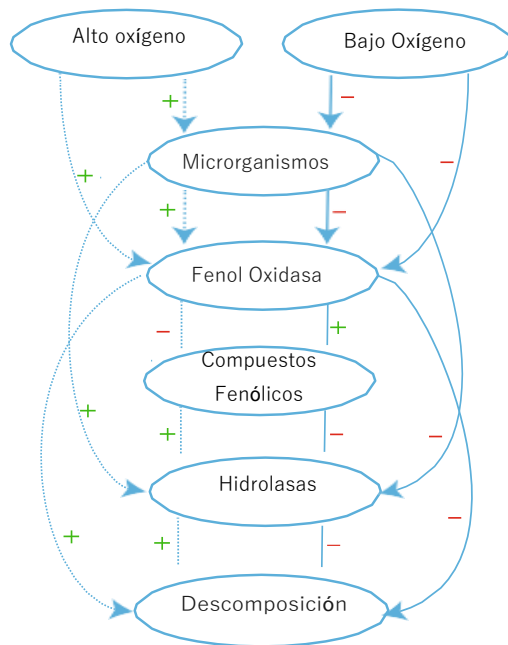
## Introducción

La fenol oxidasa, es una enzima encargada de catalizar los procesos de oxidación de compuestos fenólicos, ya que permite transformar la materia orgánica en compuestos más pequeños y solubles a través de procesos de oxidación parcial, liberación de productos intermedios oxidativos o completa degradación y formación de productos finales no fenólicos, como el CO<sub>2</sub> (Durán, Rosa, D'Annibale, & Gianfreda, 2002; Jung, Lal, & Ussiri, 2011). Es por esto que dicha enzima cumple un papel importante en el control de las tasas de descomposición en sistemas de humedal tipo turbera y por consiguiente en la producción de gases de efecto invernadero por acción de la población microbiana.

Freeman, Ostle, Fenner, & Kang (2004), afirman que la ausencia de oxígeno en turberas restringe la actividad de la enzima fenol oxidasa por condiciones de anaerobiosis como se muestra en figura 1 y a su vez posibilita la acumulación de compuestos fenólicos capaces de inhibir o regular en el suelo de la turba la acción de otras enzimas como la hidrolasa, la cual ejecuta de igual manera procesos de efecto catalítico para sustancias orgánicas en presencia de agua y no es relativamente afectada por la disponibilidad de oxígeno, característica que la hace ideal para la degradación en condiciones de suelos saturados a mayor profundidad. Entonces la supresión de las fenol oxidasas y la acumulación resultante de compuestos fenólicos particularmente en turberas, es considerada como la principal razón por la cual tales ecosistemas acumulan vastos depósitos de carbono orgánico (N. Fenner, Freeman, &

Reynolds, 2005; Freeman, Evans, Monteith, Reynolds, & Fenner, 2001; Freeman et al., 2004).

**Figura 1.** Diagrama esquemático que muestra el papel del oxígeno en el control de la descomposición. Las flechas sólidas muestran los efectos del aumento de oxígeno y las flechas discontinuas muestran los efectos del bajo nivel de oxígeno en el proceso. El signo "+" indica los efectos estimulantes (positivos) y el signo "-" indican efectos supresores (negativos). Los procesos en el lado derecho ocurren cuando se da un bloqueo enzimático y el proceso en el lado izquierdo muestra cuando se desbloquea el proceso.



**Fuente:** Modificado de Saraswati, Dunn, Mitsch, & Freeman, (2016)

Es importante resaltar que cuando la materia orgánica se encuentra en zonas con baja disponibilidad de oxígeno los compuestos presentes no se degradan o lo hacen de forma paulatina y sosegada, debido principalmente a que la velocidad de producción supera la tasa de degradación (Freeman, Evans, et al., 2001; Jung et al., 2011; Pind, Freeman, & Lock, 1994), como se da en sistemas tipo turbera en donde la tasa de producción de materia orgánica es relativamente elevada. Sumado a lo anterior, con el aumento en el gradiente de profundidad se dan significativos cambios físicos y químicos en el conjunto agua-suelo en los humedales; cambios que a su vez promueven que la actividad de las poblaciones microbianas tiendan a producir compuestos fenólicos solubles como el humus, los cuales inhiben la producción de la enzima fenol oxidasa y con ella la tasa de descomposición de materia orgánica (Sinsabaugh, 2010). Este aspecto afecta el ciclo del carbono e induce a que los microorganismos que actúan en sinergia con la fenol oxidasa existan en menor proporción así que decrece la tasa de producción de carbono (Carreiro, Sinsabaugh, Repert, & Parkhurst, 2000).

Hoy en día, existe cuantiosa información, sobre los comportamientos de turberas en países extratropicales, pero, cuando se trata de estudios en ecosistemas a nivel tropical y subtropical, se encuentran reducidas referencias que den respuesta a las dinámicas de los mismos. Entonces, se hace relevante estudios más detallados respecto a la turberas tropicales (Bacon et al., 2017; Lawson, Jones, Kelly, Coronado, & Roucoux, 2014), puesto que difieren de las turberas extratropicales por aspectos biológicos de dominancia vegetal; aspectos respecto al ciclo hidrológico por

fluctuaciones de mayor amplitud en la capa freática, disponibilidad de nutrientes y diferencias marcadas de temperatura. Además del porcentaje de área específico a cada sitio de estudio y la magnitud de almacenamiento de carbono (Brown, Strack, & Price, 2017; Dieleman, Branfireun, McLaughlin, & Lindo, 2016; Sánchez, Chimner, Hribljan, Lilleskov, & Suárez, 2017; Strack et al., 2016; Yu, Loisel, Brosseau, Beilman, & Hunt, 2010).

Por otro lado, Kelly et al., (2014) y Lawson et al., (2014) sugirieron que, incluso debajo del nivel freático, las turbas tropicales pueden estar bien oxigenadas (ver también Bacon et al., 2017; Wüst & Bustin, 2001) y presentar conductividades hidráulicas más altas que en muchas turberas no tropicales (Baird et al., 2017; Kelly et al., 2014). Dichas afirmaciones representan un interrogante frente a el análisis enzimático, y específicamente de la fenol oxidasa la cual se ve restringida según la cantidad de oxígeno disponible.

## Justificación

Las turberas de latitudes tropicales, debido a que sus grandes depósitos de carbono tienen el potencial de generar una retroalimentación positiva sobre la acumulación atmosférica de gases de efecto invernadero. Las acumulaciones de turba son el producto de un ambiente caracterizado por baja disponibilidad de oxígeno, bajo pH y baja temperatura. Estas condiciones limitan la descomposición de la materia orgánica en la medida en que su almacenamiento aísla efectivamente compuestos del ciclo global del carbono. Por su lado, el alto contenido fenólico de la turba es inhibidor de microorganismos y enzimas extracelulares. Por lo tanto, las actividades de fenol oxidasa es especialmente crítica para comprender las posibles respuestas al cambio climático global (Freeman et al., 1996, 2004; Freeman, Ostle, & Kang, 2001).

Esta investigación, se hace relevante ya que a través del análisis de la fenol oxidasa y la acumulación de compuestos fenólicos se puede dar una base acerca del comportamiento de los procesos en el ecosistema y las tasas de ciclo de nutrientes y carbono. Este conocimiento es necesario para estimar los índices de emisión o acumulación de gases producto de biogénesis en la descomposición de la materia orgánica. Además, constituye una directriz para establecer posibles mecanismos de conservación y prevención, y para la adopción de estrategias locales de mitigación y adaptación al cambio climático, en busca de disminuir sus efectos negativos. Por su parte, La actividad enzimática también es considerada a modo de indicador de la calidad del suelo (Sinsabaugh, 2010) como resultado de la dependencia directa de la

dinámica de la biota del suelo y la sensibilidad al manejo aplicado. La determinación del funcionamiento de los procesos enzimáticos se puede utilizar como una medida de la diversidad funcional microbiana y la evaluación de las características ecológicas microbianas.

Además, se busca contribuir con la estructuración del análisis del proceso de secuestro de carbono y de las emisiones de metano en humedales de alta montaña ya que este conocimiento es de vital importancia para el diseño de políticas y lineamientos de planes de manejo en pro de la conservación de ecosistemas de humedal y la oferta de servicios ambientales que ofrecen. Cabe resaltar que los resultados obtenidos durante el proceso investigativo serán utilizados para desarrollar uno de los objetivos específicos de la investigación en curso “Acumulación de carbono y emisiones de metano en un humedal de alta montaña del páramo de Belmira”, del grupo de investigación aplicado al medioambiente GAMA de la corporación universitaria lasallista.

### **Pregunta de investigación**

Con el fin de conocer los índices de emisión o acumulación de gases producto de biogénesis en sistemas de humedal tipo turbera se plantea el siguiente interrogante.

¿Cómo varia la actividad de la enzima fenol oxidasa y la concentración de compuestos fenólicos a lo largo de un gradiente de niveles de agua y diferentes profundidades de suelo en un humedal de alta montaña?

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Analizar la actividad de la enzima fenol oxidasa y la concentración de compuestos fenólicos a lo largo de un gradiente de niveles de agua y diferentes profundidades de suelo en un humedal de alta montaña del páramo de Belmira. Antioquia.

### **Objetivo específico**

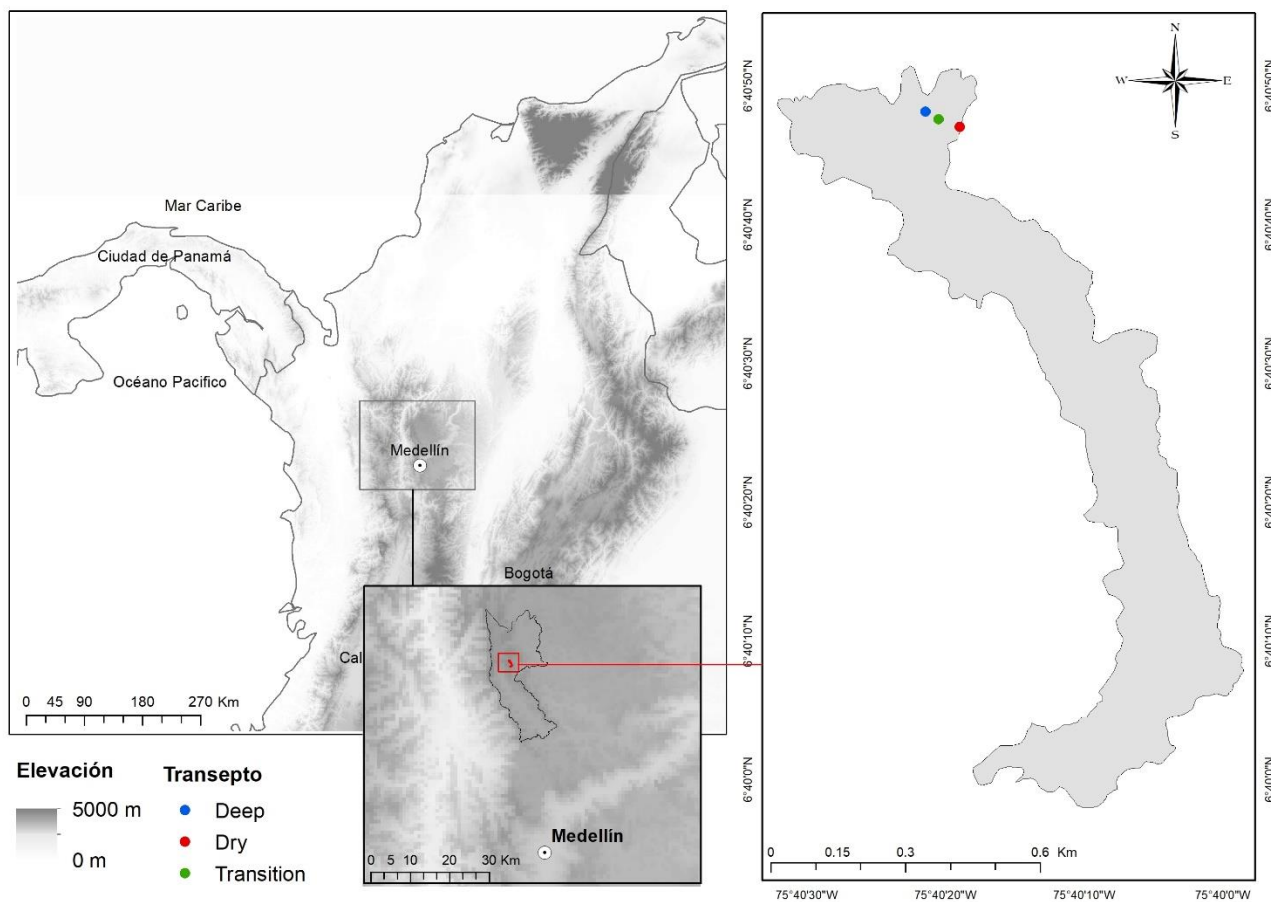
- Determinar la variación de la actividad de la enzima fenol oxidasa a lo largo de un gradiente de niveles de agua y diferentes profundidades de suelo.
- Determinar la variación en la concentración de compuestos fenólicos en el gradiente de niveles de agua y en las diferentes profundidades de suelo.

## Metodología

### Área de estudio

Las muestras se recolectaron en el humedal del páramo Santa Inés, sitio sin intervención antropogénica ubicado en la parte alta del norte de la Cordillera Central de los Andes, Noroccidente medio del departamento de Antioquia ( $6^{\circ}40'39.17''N$ ,  $75^{\circ}40'20.57''O$ ) en el municipio de Belmira. El área hace parte del "Sistema de Páramos y Bosques Altoandinos", una unidad administrativa de la autoridad ambiental regional (Corantioquia), quienes se encargan de garantizar la protección de la biodiversidad en la zona (Morales et al., 2007). En esta región, la vegetación característica en altitudes medias a altas (2800-3000 msnm), consiste en formaciones de bosques andinos montanos y áreas de mosaico que incluyen diversos tipos de coberturas y bosques naturales en diferentes etapas de sucesión ecológica; por su parte, en las elevaciones más altas (3000-3350 msnm) existe una configuración dominada por vegetación de páramo, compuesta principalmente por pastizales naturales, algunos parches de bosque y otras especies propias de la cobertura de páramo (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2011). Debido a su posición en el paisaje, este humedal recibe y almacena agua lluvia, la cual es la principal fuente de entradas de agua a la cuenca que abastece el humedal.

**Figura 2.** Área de estudio del Páramo de Belmira en los Andes tropicales centrales del norte.



## Toma de Muestras

Para la recolección de las muestras de turba, se seleccionaron varias comunidades de plantas, cuyos individuos subsistían a lo largo de tres gradientes de profundidad en el cual se establecieron tres niveles: (1) parcialmente seco a -6.3 cm, (2) una zona de transición a -0.3 cm y otra (3) zona mayormente inundada a 72.1 cm; denominados Dry, Transition y Deep, respectivamente. Se crearon parcelas con dimensiones de 1.50 m y en cada una de ellas se establecieron 6 puntos de muestreo

para la extracción de monolitos de 70 cm x 70 cm y agua de poro, ambos en las regiones de 0-10 cm y de 10-20 cm. En cada parcela se extrajeron 6 muestras del núcleo de la turba dentro de un muestreador cilíndrico de Policloruro de vinilo (10 cm de diámetro y 50 cm de longitud). Posteriormente se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno a 4°C (Wright, A.L, Reddy, 2001) para garantizar la preservación hasta la medición evitando el congelamiento.

Respecto a las muestras de agua, en el momento del muestreo, la capa freática estaba cerca de la superficie. Se utilizaron tubos perforados (Peepers) en cada uno de los 6 puntos de cada parcela, garantizando que el agua de poro tomada perteneciera a las profundidades establecidas. La extracción se realizó mediante un sistema de bombeo al vacío utilizando la diferencia de presión como principio para transportar el agua a través de mangueras de corta longitud hasta el recipiente de almacenamiento. Las muestras se almacenaron en envases de 120 ml hasta el aforo para evitar la interferencia del oxígeno y se transportaron al laboratorio de Química Ambiental de la Corporación Universitaria Lasallista para los análisis enzimáticos. Durante el transporte y hasta su procesamiento, las muestras se almacenaron bajo 5°C (nunca por debajo de 4°C) (Dunn, Jones, Girard, & Freeman, 2014; Floch, Alarcon, & Criquet, 2007; Pind et al., 1994; Wollum, 1994) y se regresó a temperaturas de campo por 2 hora antes de realizar cualquier análisis.

## Procesamiento y análisis de muestras

### Actividad enzimática

Se retiraron raíces y restos de material vegetal en las muestras de suelo a través de un proceso de tamizaje de tamaño 0.5  $\mu\text{m}$ . Con el fin de minimizar la disrupción celular, se utilizó un Stomacher (AES Laboratoire MIX 2 Vp1.13) para la homogeneización y se realizó una dilución 1: 1 con agua desionizada (tanto en las muestras de agua como en las de suelo). Se transfirieron alícuotas de 4.5 ml para replicar en tubos de centrífuga de 15 ml (Pind et al., 1994). A cada tubo, se añadieron 4.5 ml de solución de L-Dopa (L-Dopa en buffer Acetato a concentración de 10 mM) y para el control 4.5 ml de agua desionizada. Los tubos se incubaron en un agitador durante 1 y 3 minutos. Inmediatamente después, se realizó centrifugación a 12000 r.p.m durante 5 minutos para terminar la reacción. El sobrenadante se filtró a través de membranas de Nylon (diámetro 47mm y tamaño de poro de 0.22 $\mu\text{m}$ ). La absorbancia se midió a 450 nm durante 1 hora en Placas de microtitulación para obtener la cinética de la reacción. Finalmente, la actividad se expresó en términos de  $\mu\text{Mol diqc g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $\mu\text{Mol}$  de 2, 3-dihidroindol-5,6-quinona-2-carboxilato por minuto por g de turba utilizado en cada ensayo) (Delgado, López, & Giraldo, 2001; Tabatabai, 1994), utilizando la ley de Beers (Pind et al., 1994) y un coeficiente de extinción micromolecular para diqc de  $3,7 \times 10^4$  (Dunn et al., 2014; Mason, 1948; Waite, 1976), coeficiente que da razón de cuan fuerte la sustancia absorbe la luz a la longitud de onda dada (Carreiro et al., 2000; Sinsabaugh, Gallo, Lauber, Waldrop, & Zak, 2005). El Tiempo de incubación se varió

entre 1 y 3 minutos (Freeman et al., 2004; Pind et al., 1994) para determinar las condiciones óptimas de incubación en el momento en que se diera linealidad en el proceso de oxidación de L-DOPA a lo largo del tiempo para cada tipo de suelo. Vale la pena mencionar que dicho tiempo de incubación puede variar de un minuto (Pind et al., 1994) a una hora (Prosser, Speir, Stott, & Dick, 2011). Sin embargo, se ha demostrado previamente que no debe permitirse que el ensayo exceda una hora ya que la L-DOPA se vuelve inestable en presencia de oxígeno y, por lo tanto, las velocidades de reacción ya no son lineales (Sinsabaugh, Klug, Collins, Yeager, & Petersen, 1999).

### **Compuestos Fenólicos**

La concentración de compuestos fenólicos se determinó utilizando la prueba estándar de fenoles test 1-75 NANOCOLOR ® (REF 918 75 rango de medición 0.01-7.0). Basada en la determinación fotométrica de fenoles y compuestos capaces de formar colorantes de antipirina por acoplamiento oxidativo con 4-aminoantipirina. Para esto se adicionó en matraces volumétricos, hidróxido de amonio (Reactivo R1) y unas cuantas partículas de Fosfato dipotásico (Reactivo R2 que contiene sodio nitrito 1–5 %) hasta que la solución fuera incolora, se tomaron 20 ml de agua de las muestras de poro y se adicionaron a la mezcla seguido de una agitación manual, finalmente se agregó una solución de aminoantipirina (Reactivo R3 que contiene sodio carbonato 10–20 % y Ferrocianuro de potasio), se agitó nuevamente y se llevó al aforo; allí, el fenol reaccionó con el compuesto logrado (4-nitroanilina diazotada) para formar un colorante entre amarillo, marrón y rojo (American Public Health Association [APHA], 2012; Box,

1983; Folin & Ciocalteu, 1927). Pasados 5 minutos se realizó la lectura de absorbancia a 470 en el espectrofotómetro (Modelo NUV0766, Versión 5.0) para finalmente obtener las concentraciones en cada transecto.

En la matriz de suelo, se utilizaron 5 g de suelo húmedo en una solución con 50 ml de agua destilada y 1g de carbón activado, para eliminar interferencias en la lectura de absorbancia por parte de la descomposición de la materia orgánica y los ácidos húmicos (APHA, 2012). Posterior a esto se realizó una filtración de membrana con filtros de acetato de celulosa de 47 mm de 0.45  $\mu\text{m}$ , para eliminar los materiales coloidales y para la esterilización por filtración (Dunn & Freeman, 2017; Pind et al., 1994). Los homogenados de turba se prepararon usando un Stomacher como se indica anteriormente. El contenido fenólico fue determinado usando el ensayo 1-75 NANOCOLOR® y los principios de Box (1983).

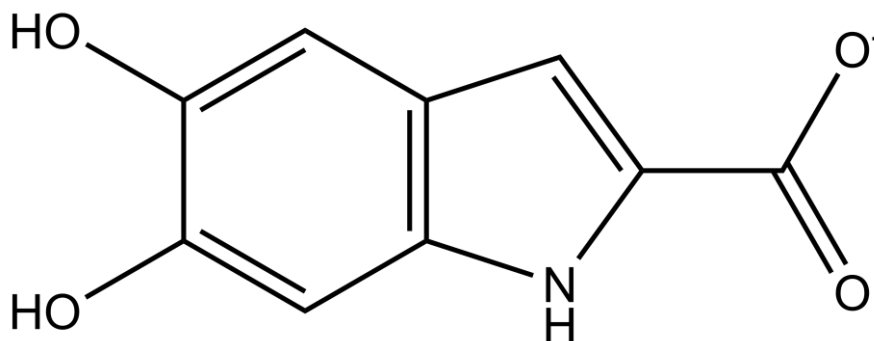
### **Análisis de la información**

Se intentó relacionar la actividad de la enzima con las concentraciones de compuestos fenólicos (Box, 1983; Freeman et al., 2004; Min, Freeman, Kang, & Choi, 2015) encontrados en el perfil de la turba. Para ello, se sometieron los datos a una prueba de normalidad e igualdad de varianzas en busca de determinar si era posible comparar entre sitios y profundidades. Posterior a esto se realizó la prueba t de muestras independientes para observar las diferencias. La prueba t supone que los datos son continuos, al menos aproximadamente distribuidos normalmente y que las

varianzas de los dos conjuntos son homogéneas (estas suposiciones fueron probadas antes de que la prueba se llevara a cabo).

Para cuantificar la actividad específica de la enzima fenol oxidasa, se obtuvo la variación lineal de la absorbancia respecto al tiempo en la cinética de la reacción. La pendiente de dicha reacción es el valor expresado para una unidad enzimática respecto a su Coeficiente de extinción micromolecular, valor tomado como la cantidad de enzima que transformó 1  $\mu\text{mol}$  de L-Dopa a Dopaquinona (Figura 3) en un min.

**Figura 3.** Estructura química del compuesto obtenido, Dopaquinona. ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{NO}_4$ , WT. 192.149)



## Resultados y discusión

La igualdad de varianzas sugiere que no hay evidencia de que las varianzas sean desiguales (valores iguales o menores a 0.05) como se muestra en la Tabla 1 y 2; por lo que es muy poco probable que los dos medios de muestra provengan de una población con la misma media real, razón por la cual no hubo razones para suponer que la distribución de los análisis distaron mucho de un comportamiento normal y fue posible comparar entre profundidades y entre sitios las matrices de estudio, además se obtuvo, que las muestras no presentan diferencia estadística significativa ( $p < 0.5$ ) ya que los valores medios de los dos grupos no son mayores a los esperados por casualidad.

**Tabla 1.** Descriptivos actividad enzimática.

	Dry		Transition		Deep	
Test de Normalidad	0.064	0.809*	0.317	0.058*	0.511	0.440*
Igualdad de Varianzas	0.790	0.380*	0.581	0.822*	0.456	0.734*
Diferencia estadística	0.001	0.013*	0.321	0.418*	0.170	0.102*
t	4.457	3.037*	0.233	0.846*	1.480	1.798*

\* Matriz de agua de poro

**Tabla 2.** Descriptivos Compuestos fenólicos.

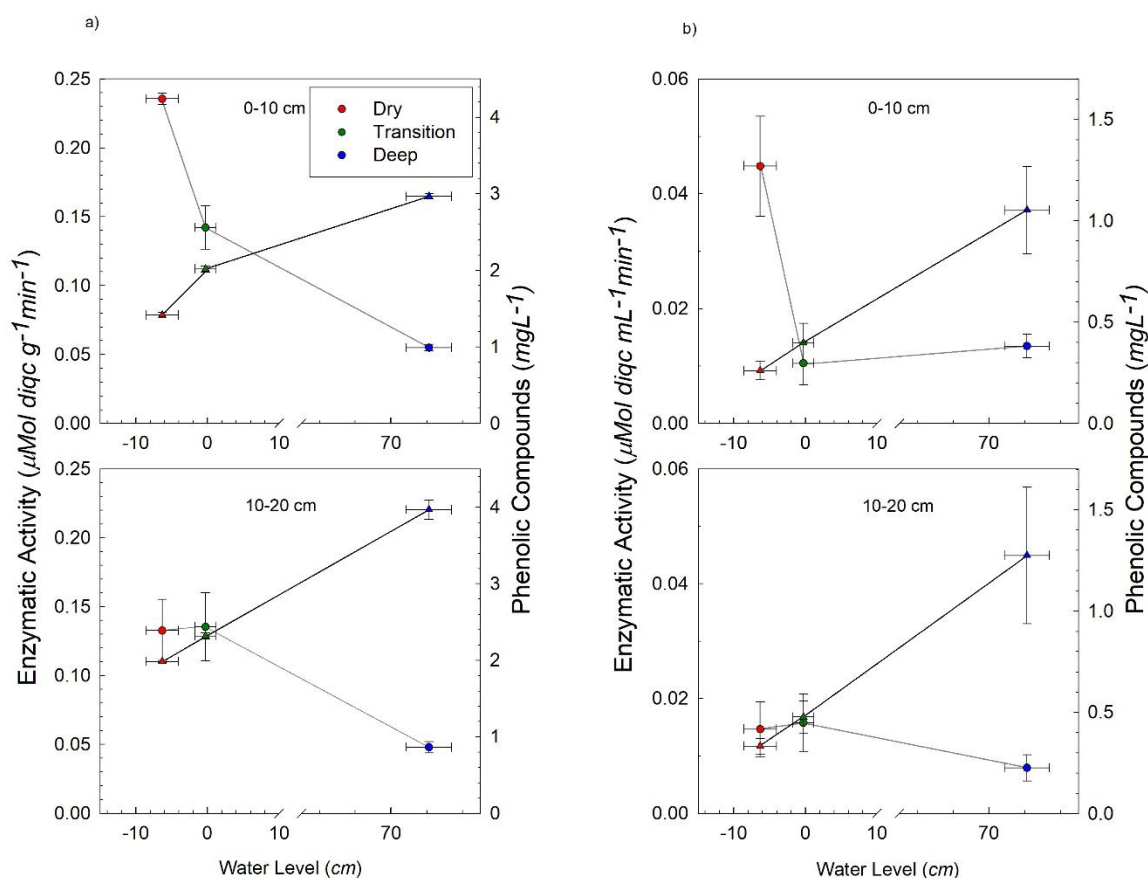
	Dry		Transition		Deep	
Test de Normalidad	0.135	0.497*	0.123	0.915*	0.774	0.050*
Igualdad de Varianzas	0.26	0.444*	0.426	0.617*	0.050	0.652*
Diferencia estadística	<0.001	0.245*	<0.001	0.535*	0.002	0.818*
t	-16.2	-1.236*	-5.29	-0.643*	21.00	37.00*

\* Matriz de agua de poro

La actividad de la enzima fenol oxidasa se correlacionó positivamente con la concentración fenólica a lo largo del gradiente con un Intervalo de confianza del 95 por ciento para la diferencia de medias y según la distribución espacial de la enzima en profundidades. Dentro del perfil de la turba, se evidenció que la actividad cae rápidamente con la profundidad, por lo que describe un comportamiento inverso en relación a la concentración de compuestos fenólicos como se muestra en la figura 4 reafirmando lo expuesto por Dunn & Freeman (2017).

Por su parte, los ensayos preliminares mostraron que la tasa de oxidación de L-Dopa a Diqc se aproxima a la linealidad en periodos cortos de incubación, por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron durante períodos de incubación de 3 minutos. La ventaja de un tiempo de incubación corto (menor a una hora) fue que eliminó los efectos del crecimiento microbiano y el metabolismo que pueden ocurrir durante largos ensayos lo que permitió evitar el uso de inhibidores microbianos como el tolueno, que no es adecuado porque los microorganismos que producen el material enzimático pueden usar tolueno como única fuente de carbono (Kaplan & Hartenstein, 1979). Por supuesto, se puede prever aumentar este tiempo de incubación cuando la actividad de la fenol oxidasa en las muestras sea mucho menor. Cabe resaltar que los valores de actividad y por ende de concentración de fenoles fueron mayores en la matriz de suelo respecto a los obtenidos en agua de poro por lo cual sería pertinente pensar un ensayo con tiempos de incubación más prolongados en relación a las diferentes matrices de estudio evaluadas por separado.

**Figura 4.** Actividad enzimática Vs concentración de compuestos fenólicos en la matriz de suelo (a) y agua de poro (b) en el humedal (media  $\pm$  S.E., n = 6). Donde  $\circ$ : Actividad de la enzima fenol oxidasa,  $\Delta$ : contenido de compuestos Fenólicos.



Además, el sitio Transition y el sitio Deep mostraron similitudes en la cinética de actividad enzimática en agua, por lo que es posible inferir que en el humedal de estudio, la mayor actividad se concentró en profundidades con un nivel de agua no mayor a un metro (0-6 cm sobre la superficie) en zonas parcialmente secas. Por su parte, la enzima se comporta de forma diferente en el suelo, siendo los sitios Dry y Transition muy similares con el incremento de profundidad.

Entonces, a mayores profundidades se logró una menor actividad enzimática, similar a lo encontrado por (Freeman et al., 2004; Sinsabaugh, 2010); debido principalmente a restricciones según la disponibilidad de oxígeno en el punto de muestra en el humedal. Lo anterior pudo haber permitido que los materiales fenólicos se acumularan, como lo sugiere la fuerte correlación inversa entre la concentración fenólica y la actividad enzimática ( $p < 0.05$ ) siendo esta acumulación más marcada en el gradiente de inundación con mayor profundidad en la lámina de agua, sitio Deep del estudio; donde los procesos de oxidación son bajos por la reducida disponibilidad de oxígeno y la poca respuesta de la enzima bajo dichas condiciones. Sin embargo, la tendencia de acumulación de fenoles, describe un comportamiento lineal a lo largo del perfil de la turba con excepciones en la matriz de suelo en los niveles superficiales del muestreo (0-10 cm).

En el estudio, se encontró que el uso de 5 g de suelo era satisfactorio para detectar rutinariamente la actividad de la enzima y la concentración de fenoles en cada muestra, sin embargo, esto depende tanto del tipo de suelo como del tipo de enzima seleccionada. Por ejemplo, Eivazi & Tabatabai, (1988) mostraron que se obtuvieron relaciones lineales utilizando hasta 2 g de suelo para 10 ml de solución de incubación.

Finalmente A través de este análisis de la actividad de la fenol oxidasa y la acumulación de compuestos fenólicos se crea un acercamiento más acertado con miras a entender el comportamiento de los procesos en el ecosistema, y las tasas de ciclo de nutrientes y carbono, ya que las oxidasas, y específicamente para este estudio las fenol oxidasas, están implicadas en la transformación lenta de compuestos

recalcitrantes como la materia orgánica disuelta de difícil degradación o la presencia de lignina y compuestos organoclorados u aromáticos. La baja tasa de degradación de estos compuestos recalcitrantes, es uno de los factores clave en los procesos biogeoquímicos en los ecosistemas de suelo parcialmente inundados (Floch et al., 2007). Así, el ensayo es particularmente útil para comprender el papel desempeñado por la fenol oxidasa en estas bajas reacciones y para estudiar sus patrones espaciales en relación a la acumulación de compuestos fenólicos. Además, con la perspectiva de la calidad del suelo y las evaluaciones del riesgo ambiental, este análisis permite que la actividad de la enzima se utilice como un bioindicador para estimar las tasas de degradación de compuestos orgánicos y el almacenamiento o producción de trazas de gas basadas en carbono ( $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ), puesto que los flujos medios de carbono en el cuerpo del humedal, según afirman Deng, Dick, Freeman, Kandeler, & Weintraub, (2017); Dunn & Freeman, (2017) están igualmente relacionados de forma inversa con el contenido de material fenólico. Lo anterior permite comprender los procesos de descomposición en los humedales y cómo estos se ven afectados por los cambios en los factores ambientales (Nathalie Fenner & Freeman, 2011), los niveles de  $\text{CO}_2$ , la temperatura y los cambios en el uso del suelo.

Se obtuvo entonces, que la medición de la actividad enzimática y el contenido de compuestos fenólicos ofrece un medio relativamente rápido y directo de investigar los ciclos en suelos y aguas puesto que a medida que nuestro clima continúa cambiando, comprender cómo estos factores controlan los ciclos biogeoquímicos puede permitirnos prevenir las condiciones que producen procesos potencialmente dañinos, es decir, una

mayor descomposición de la materia orgánica que conduce a mayores emisiones biogénicas de Gases de efecto invernadero.

## **Conclusiones**

La variación de la profundidad en el sitio, a través de un gradiente de niveles de agua y diferentes profundidades de suelo, demuestra que la actividad de la enzima fenol oxidasa es un factor relevante en la transformación de los compuestos orgánicos que conforman el complejo del humedal, por lo que puede revelar parte de las dinámicas que en el suceden así como indicar los niveles de acumulación de compuestos fenólicos y que dan pie a describir la función ecosistémica en relación a el almacenamiento de carbono.

### **Recomendaciones**

El protocolo para analizar la actividad de un conjunto de enzimas fenol oxidasas permite una investigación en profundidad de la biogeoquímica de los humedales. La actividad de las enzimas en los suelos de los humedales se ha determinado durante una gran cantidad de estudios que abarcan una amplia gama de tipos de suelos de humedales, pero sigue habiendo una falta de coherencia en los procedimientos metodológicos empleados. Como resultado, actualmente es difícil comparar de manera confiable las actividades informadas por diferentes estudios donde se han utilizado métodos diferentes. Se sugiere entonces que se adapte un método común de determinación de la actividad enzimática como el propuesto por Deng et al., (2017); Dunn et al., (2014), que pueda aplicarse universalmente a los suelos y el agua de los humedales.

## Referencias

- American Public Health Association, A. P. H. A. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (E. Rice, R. Baird, A. Eaton, & L. Clesceri, Eds.) (22nd ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Bacon, K., Baird, A., Blundell, A., Bourgault, M., Chapman, P., Dargie, G., ... Young, D. (2017). Questioning ten common assumptions about peatlands. *Mires and Peat*, *19*(12), 1–23. <https://doi.org/10.19189/MaP.2016.OMB.253>
- Baird, A. J., Low, R., Young, D., Swindles, G. T., Lopez, O. R., & Page, S. (2017). High permeability explains the vulnerability of the carbon store in drained tropical peatlands. *Geophysical Research Letters*, *44*(3), 1333–1339. <https://doi.org/10.1002/2016GL072245>
- Box, J. D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*, *17*(5), 511–525. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90111-2)
- Brown, C. M., Strack, M., & Price, J. S. (2017). The effects of water management on the CO<sub>2</sub> uptake of Sphagnum moss in a reclaimed peatland. *Mires and Peat*, *20*(5), 1–15. <https://doi.org/10.19189/MaP.2016.OMB.258>
- Carreiro, M., Sinsabaugh, R. L., Repert, D. A., & Parkhurst, D. F. (2000). Microbial Enzyme Shifts Explain Litter Decay Responses, *81*(9), 2359–2365. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[2359:MESELD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[2359:MESELD]2.0.CO;2)
- Delgado, F., López, Y., & Giraldo, E. M. (2001). Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas*, *1*(60),

43–49. Retrieved from <http://www.sidalc.net/REPDOC/A1760E/A1760E.PDF>

Deng, S., Dick, R., Freeman, C., Kandeler, E., & Weintraub, M. N. (2017). Comparison and standardization of soil enzyme assay for meaningful data interpretation. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 32–34. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.013>

Dieleman, C. M., Branfireun, B. A., McLaughlin, J. W., & Lindo, Z. (2016). Enhanced carbon release under future climate conditions in a peatland mesocosm experiment: the role of phenolic compounds. *Plant and Soil*, 400(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2713-0>

Dunn, C., & Freeman, C. (2017). The role of molecular weight in the enzyme-inhibiting effect of phenolics: the significance in peatland carbon sequestration. *Ecological Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.036>

Dunn, C., Jones, T. G., Girard, A., & Freeman, C. (2014). Methodologies for Extracellular Enzyme Assays from Wetland Soils. *Wetlands*, 34(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s13157-013-0475-0>

Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907–931. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4)

Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601–606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)

Fenner, N., & Freeman, C. (2011). Drought-induced carbon loss in peatlands. *Nature*

*Geoscience*, 4(12), 895–900. <https://doi.org/10.1038/ngeo1323>

Fenner, N., Freeman, C., & Reynolds, B. (2005). Observations of a seasonally shifting thermal optimum in peatland carbon-cycling processes; implications for the global carbon cycle and soil enzyme methodologies. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1814–1821. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.032>

Floch, C., Alarcon, E., & Criquet, S. (2007). ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.020>

Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–648.

Freeman, C., Evans, C. D., Monteith, D. T., Reynolds, B., & Fenner, N. (2001). Export of organic carbon from peat soils. *Nature*, 412(6849), 785–785. <https://doi.org/10.1038/35090628>

Freeman, C., Liska, G., Ostle, N. J., Lock, M. a., Reynolds, B., & Hudson, J. (1996). Microbial activity and enzymic decomposition processes following peatland water table drawdown. *Plant and Soil*, 180(1), 121–127. <https://doi.org/10.1007/BF00015418>

Freeman, C., Ostle, N. J., Fenner, N., & Kang, H. (2004). A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(10), 1663–1667. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.012>

Freeman, C., Ostle, N., & Kang, H. (2001). An enzymic 'latch' on a global carbon store. *Nature*, 409(6817), 149. <https://doi.org/10.1038/35051650>

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. (2011). *EI*

*gran libro de los Páramos*. (A. Vásquez & A. C. Buitrago, Eds.). Nomos Impresores.

Jung, J. Y., Lal, R., & Ussiri, D. A. N. (2011). Changes in CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>C abundance, inorganic nitrogen, β-glucosidase, and oxidative enzyme activities of soil during the decomposition of switchgrass root carbon as affected by inorganic nitrogen additions. *Biology and Fertility of Soils*, 47(7), 801–813. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0583-z>

Kaplan, D. L., & Hartenstein, R. (1979). Problems with toluene and the determination of extracellular enzyme activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(4), 335–338. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(79\)90044-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(79)90044-0)

Kelly, T. J., Baird, A. J., Roucoux, K. H., Baker, T. R., Honorio Coronado, E. N., Ríos, M., & Lawson, I. T. (2014). The high hydraulic conductivity of three wooded tropical peat swamps in northeast Peru: Measurements and implications for hydrological function. *Hydrological Processes*, 28(9), 3373–3387. <https://doi.org/10.1002/hyp.9884>

Lawson, I. T., Jones, T. D., Kelly, T. J., Coronado, E. N. H., & Roucoux, K. H. (2014). The Geochemistry of Amazonian Peats. *Wetlands*, 34(5), 905–915. <https://doi.org/10.1007/s13157-014-0552-z>

Mason, H. (1948). The chemistry of melanin: III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 172(2), 83–99. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Min, K., Freeman, C., Kang, H., & Choi, S. U. (2015). The Regulation by Phenolic Compounds of Soil Organic Matter Dynamics under a Changing Environment. *BioMed Research International*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/825098>

- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., ... Cárdenas, L. (2007). Atlas de Páramos. *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.*, 1, 205.
- Pind, A., Freeman, C., & Lock, M. A. (1994). Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands — measurement of phenol oxidase activity. *Plant and Soil*, 159(2), 227–231. <https://doi.org/10.1007/BF00009285>
- Prosser, J. A., Speir, T. W., Stott, D. E., & Dick, R. P. (2011). Soil Oxidoreductases and FDA Hydrolysis. In R. P. Dick (Ed.), *Methods of soil enzymology* (pp. 103–124). Madison, WI: Soil Science Society of America Inc. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c6>
- Sánchez, M. E., Chimner, R. A., Hribljan, J. A., Lilleskov, E. A., & Suárez, E. (2017). Carbon dioxide and methane fluxes in grazed and undisturbed mountain peatlands in the Ecuadorian Andes. *Mires and Peat*, 19(20), 1–18. <https://doi.org/10.19189/MaP.2017.OMB.277>
- Saraswati, S., Dunn, C., Mitsch, W. J., & Freeman, C. (2016). Is peat accumulation in mangrove swamps influenced by the “enzymic latch” mechanism? *Wetlands Ecology and Management*, 24(6), 641–650. <https://doi.org/10.1007/s11273-016-9493-z>
- Sinsabaugh, R. L. (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.10.014>
- Sinsabaugh, R. L., Gallo, M. E., Lauber, C., Waldrop, M. P., & Zak, D. R. (2005). Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry*, 75(2), 201–215. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-7112-1>

- Sinsabaugh, R. L., Klug, M. J., Collins, H. P., Yeager, P. E., & Petersen, S. O. (1999). Characterizing Soil Microbial Communities. In G. P. Robertson, D. C. Coleman, C. S. Bledsoe, & P. Sollins (Eds.), *Standard soil methods for long-term ecological research* (pp. 318–348). New York: Oxford University Press.
- Strack, M., Cagampan, J., Fard, G. H., Keith, A. M., Nugent, K., Rankin, T., ... Xu, B. (2016). Controls on plot-scale growing season CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in restored peatlands: Do they differ from unrestored and natural sites? *Mires and Peat*, 17(5), 1–18. <https://doi.org/10.19189/MaP.2015.OMB.216>
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. In P. Bottomley, S. Angle, C. R.W. Weaver, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties* (pp. 775–833). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37>
- Waite, J. H. (1976). Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Analytical Biochemistry*, 75(1), 211–218. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90072-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90072-5)
- Wollum, A. G. (1994). Soil Sampling for Microbiological Analysis. In P. Bottomley, S. Angle, C. R.W. Weaver, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties* (pp. 1–14). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c1>
- Wright, A.L, Reddy, K. R. (2001). Phosphorus Loading Effects on Extracellular Enzyme Activity. *Soil Sci Soc Am J*, 65(2), 588–595.
- Wüst, R. A. J., & Bustin, R. M. (2001). Low-ash peat deposits from a dendritic,

intermontane basin in the tropics: A new model for good quality coals. *International Journal of Coal Geology*, 46(2–4), 179–206. [https://doi.org/10.1016/S0166-5162\(01\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0166-5162(01)00021-0)

Yu, Z., Loisel, J., Brosseau, D. P., Beilman, D. W., & Hunt, S. J. (2010). Global peatland dynamics since the Last Glacial Maximum. *Geophysical Research Letters*, 37(13). <https://doi.org/10.1029/2010GL043584>

## Apéndices

### Apéndice A. Registro fotográfico

#### Delimitación de parcelas



### Sistema de muestreo de agua de poro





Peeper





### Sistema de muestreo de suelo de la turba





