

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 1. Medición de la actividad respiratoria para detectar actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero,
Cecilia Martín y María C. Iglesias

La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica del mismo y se pone de manifiesto a través del desprendimiento de CO_2 o el consumo de O_2 , resultante del metabolismo de los organismos vivos existentes en el suelo. Todos los microorganismos heterótrofos tienen la propiedad de degradar la materia orgánica, obteniendo la energía que necesitan para su desarrollo a través de la descomposición de celulosa, proteínas, nucleótidos y compuestos humificados. En estas condiciones redox de oxidación de la materia orgánica por los microorganismos (respiración microbiana), el oxígeno funciona como aceptor final de electrones obteniéndose como producto final del proceso CO_2 y agua. Por lo tanto, la actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede ser medida mediante el desprendimiento de CO_2 o el consumo de O_2 (García Izquierdo *et al.*, 2003).

El tipo de manejo que se le realice al suelo afecta de algún modo la calidad del mismo y su capacidad para funcionar dentro de los límites del ecosistema, perturbando su productividad biológica. El estudio de la calidad biológica y bioquímica de un suelo puede servir como indicador de su estado general. Para esto, son necesarios parámetros de actividad microbiana que ayuden a conseguir este conocimiento, y la respiración de los microorganismos del suelo es uno de ellos (Doran y Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 1997; Doran y Zeiss, 2000; Doran, 2002; Hernández y García, 2003).

La respiración del suelo tiene un claro significado ecológico y una enorme importancia dentro del conocimiento de la calidad y salud del mismo. Es uno de los parámetros más antiguos y más frecuentemente usados para cuantificar la actividad microbiana en el suelo. El uso de este índice microbiológico ha permitido estimar la actividad general de la biomasa y cómo esta es influenciada

por el clima, las propiedades físicas y químicas o prácticas de manejo agrícola, tales como la labranza y las rotaciones de cultivos (Martínez, Fuentes y Acevedo, 2008).

Todas las investigaciones se han basado en incubaciones de suelo, ya sea *in situ* o en laboratorio, con medición de productos finales como el CO₂, lo que ha permitido conocer la mineralización y estabilidad del carbono con relación a la cantidad y calidad de la materia orgánica presente y las prácticas de manejo agronómico (Campbell *et al.*, 1992).

En la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE) se estandarizó una técnica para la determinación de la actividad respiratoria mediante la captación de CO₂, realizando ajustes a técnicas descritas anteriormente por otros autores (Öhlinger, 1996; Frioni, 2011) y, de esta forma, se han podido estudiar numerosos ensayos donde se aplican diferentes prácticas de manejo agrícolas.

1.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El suelo es incubado en un sistema aeróbico cerrado, tanto con humedad como con temperatura constante y controlada. El CO₂ producido es absorbido en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) que es posteriormente valorada por titulación con un ácido.

1.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

Cuantificar la actividad microbiana en un sistema aeróbico para detectar diferencias que puedan estar asociadas a prácticas agrícolas o a una acción antrópica.

1.3. EQUIPAMIENTO

Los elementos necesarios para detectar la respiración microbiana son los siguientes.

- Estufa para incubación
- Frascos y bolsas para incubación
- Pipetas
- Buretas
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.4. REACTIVOS

Los reactivos que se necesitan son los detallados a continuación.

- Ácido clorhídrico 0,5 N
- Hidróxido de sodio 0,5 N
- Cloruro de bario 2%
- Fenolftaleína (indicador ácido-base).

1.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se trabaja con muestras de suelo secas al aire, molidas y tamizadas con malla de 2 mm.

1.6. PROCEDIMIENTO

Este método se basa en la cuantificación de CO₂ desprendido durante la incubación del suelo en un sistema cerrado. El CO₂ es atrapado en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) que es posteriormente valorada con ácido clorhídrico (HCl) (Öhlinger, 1996; Frioni, 2011).

1.6.1. Humedecimiento de la muestra a incubar

Se deben colocar 30 g de suelo en un recipiente y se procede al agregado de gotas de agua con una pipeta Pasteur, mientras se remueve la mezcla con una cuchara, a modo de lograr la homogeneidad de la muestra tanto en contenido de humedad como en color. La finalidad es lograr una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (García Izquierdo *et al.*, 2003) que, de acuerdo con una gran base de datos generada en el laboratorio de la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE), se pudo estimar que correspondería al 20 o 30% de la capacidad máxima de retención hídrica, según el tipo de suelo.

Luego, se registran en una planilla el peso seco y el peso húmedo de cada muestra, para posteriormente determinar el porcentaje de humedad de incubación con la fórmula:

$$\% \text{Humedad} = [(\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}) / \text{Peso suelo seco}] \times 100$$

1.6.2. Armado de los dispositivos de incubación

Se prepara un frasco por cada muestra que se quiera estudiar y en cada frasco se cargan 40 ml de una solución de hidróxido de sodio

(NaOH) 0,5 N. La muestra de suelo humedecida se introduce en una bolsita de polietileno de 30 micrones de espesor, puesto que este material es permeable a los gases (CO₂, O₂) e impermeable al vapor de agua.

Después, la bolsita con suelo se coloca de tal forma que quede suspendida dentro del frasco, sujetándola en la parte superior con la tapa al cerrar herméticamente el frasco y evitando que tome contacto con la solución. De esta manera, se generan tratamientos testigo o blancos -2 o 3, según el tamaño de la serie de muestras para analizar- y se cargan con los 40 ml de NaOH, pero sin la bolsita con suelo.

1.6.2.1. Incubación

Se llevan las muestras a incubación en estufa a 28 o 30 °C durante 7 días. Tanto la temperatura como la humedad influyen de manera muy importante en la respiración (García Izquierdo *et al.*, 2003), lo que justifica la relevancia del uso de la estufa para que todas las muestras estén sometidas a igual temperatura durante su incubación.

1.6.2.2. Titulación

En esta operación se realiza la medición por retrovaloración de la captación de CO₂ en solución alcalina. Se toma una alícuota de 10 ml de NaOH 0,5 N del frasco y se vierte en un vaso de precipitado, se le agregan unas gotas de cloruro de bario (BaCl₂) a fin de precipitar todo el CO₂ absorbido y unas gotas de fenolftaleína (indicador ácido-base) que torna de color fucsia a la solución. Esta operación se realiza por duplicado para cada muestra a fin de reducir el error en la titulación cuando se trabaja con un promedio. Con el empleo de una bureta, se aplica gota a gota el HCl 0,5 N hasta que el indicador vire de fucsia a incoloro, se registran los ml utilizados y se titulan tanto las muestras como los tratamientos «blanco».

1.7. CÁLCULOS

El CO₂ producido y liberado por la muestra se calcula por diferencia entre el título promedio de los blancos (para reducir el error operativo) y el título promedio de cada una de las muestras, y se aplica la siguiente fórmula, teniendo en cuenta todos los componentes presentes en el procedimiento.

$$\text{mg CO}_2 \times 100 \text{ g de suelo seco} = \frac{(B-M) \times N \times 22 \times 40 \times 100}{10 \times P}$$

Donde: B es el promedio de los ml de HCL gastados en la titulación de los blancos, M son los ml de HCL gastados en la muestra en cuestión, N es la normalidad del ácido, 22 es el peso equivalente del CO₂, 40 son los ml del hidróxido de sodio colocados en el frasco, 100 son los g de suelo de referencia para la determinación, 10 son los ml de la alícuota titulada y 30 son los g de suelo colocados en la bolsita.

En caso de ser necesario, se pueden obtener los mg CO₂.100g de suelo⁻¹.día⁻¹, dividiendo el resultado de la fórmula anterior por 7.

1.7.1. Resultados obtenidos en la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE

A continuación, se desarrollan los resultados obtenidos.

1.7.1.1. Determinación de respiración para detectar diferencias entre manejos agrícolas

Para este ejemplo, se trabajó con muestras provenientes de un ensayo instalado en la localidad de Monte Buey, Córdoba, cuyo diseño era una estructura factorial de tratamientos, donde se consideraban tres factores con dos niveles cada uno:

- a. Fertilización. Sin fertilización (F1) y máxima fertilización con reposición de macro y micronutrientes (F2).
- b. Siembra directa. Siembra directa interrumpida con una labor agrícola (SD1) y siembra directa continuada (SD2).
- c. Rotación. Rotación estándar de cultivos con 1,4 cultivos anuales (R1) y rotación intensiva con mayor incorporación de gramíneas y 1,8 cultivos anuales (R2).

De esta forma, con la combinación de estos factores y sus niveles, quedaron definidos ocho tratamientos. Luego de realizar la medición de la actividad respiratoria por el método descripto, se obtuvieron los mg CO₂.100g de suelo⁻¹.día⁻¹.

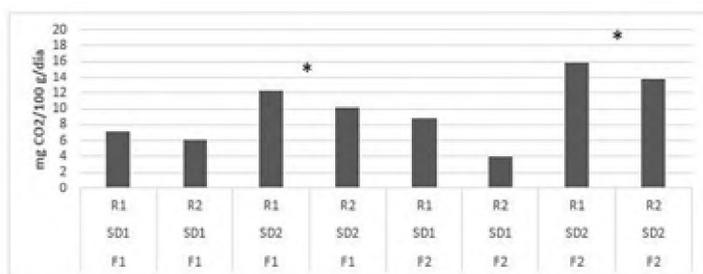


Figura N° 1. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos generados de la interacción de factores y niveles. *Los tratamientos con SD2 fueron mayores significativamente a los SD1 (tukey $p \leq 0,05$).

Se pudo observar una variabilidad en los datos de respiración obtenidos, relacionada a las prácticas agrícolas que se estudiaron en este ensayo. Luego de realizar el Anava (análisis de varianza) con el estadístico tukey ($p \leq 0,05$), se observó diferencias significativas entre los niveles de siembra directa, siendo SD2 mayor a SD1 significativamente, dentro de cada nivel de fertilidad. Es decir, se dio esta situación tanto en F1 como en F2. Las rotaciones no mostraron diferencias significativas. Cabe destacar que los datos aquí presentados corresponden a un trabajo realizado en conjunto entre la cátedra de Microbiología Agrícola de FCA-UNNE y el Grupo Romagnoli, en el establecimiento La Lucía (Monte Buey, Córdoba).

1.7.1.2. Actividad respiratoria en suelos con diferentes manejos agrícolas (Biospas)

Dentro del marco del proyecto Biología de suelos y producción agrícola sustentable (Biospas) se eligieron cuatro ambientes siguiendo una transecta oeste-este en la Argentina, en las localidades de Bengolea (BG) y Monte Buey (MB) en Córdoba, Pergamino (PG) en Buenos Aires y Viale (VL) en Entre Ríos. En todos se definieron tres tratamientos de uso del suelo bajo siembra directa, de acuerdo a la productividad sustentable, según los registros de los agricultores:

- a. Ambiente natural (AN), monte o pastizal como referencia del sitio.
- b. Buenas prácticas agrícolas (BP), gestión con rotación intensiva de cultivos, reposición racional de nutrientes y manejo integral de plagas y enfermedades.
- c. Malas prácticas agrícolas (MP), gestión con tendencia al monocultivo y sin reposición de nutrientes.

Cada muestra consistió en un compuesto de entre 16 y 20 submuestras de suelo a una profundidad de 0 a 10 cm en un área de 5 m², tomadas por triplicado, a intervalos de al menos 50 m distribuidos en el lote, evitando seguir la línea de siembra.

Se evaluaron cinco campañas de muestreo:

- Invierno de 2009 (Inv. 2009)
- Febrero de 2010 (F 2010)
- Septiembre de 2010 (S 2010)
- Febrero de 2011 (F 2011)
- Septiembre de 2011 (S 2011).

Utilizando el método antes descrito, se pudieron obtener los siguientes resultados.

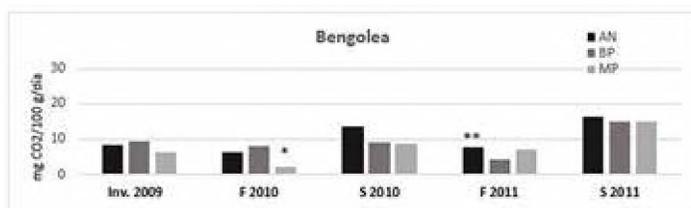


Figura N° 2. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Bengolea, en cada campaña de muestreo: *MP<BP y AN, **AN>BP y MP (tukey $p \leq 0,05$).

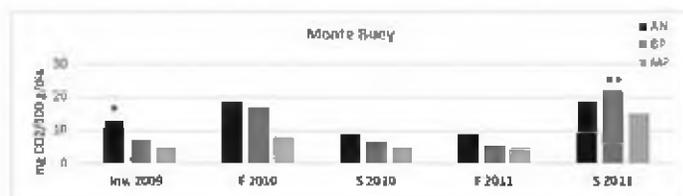


Figura N° 3. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Monte Buey, en cada campaña de muestreo: *AN>MP, **BP>MP (tukey $p \leq 0,05$).

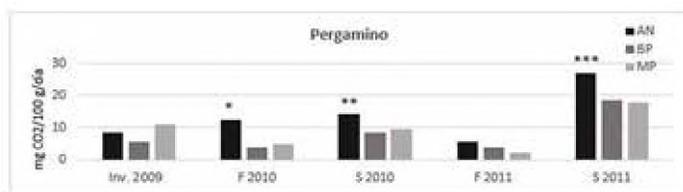


Figura N° 4. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Pergamino, en cada campaña de muestreo: *AN>BP y MP, **AN>BP, ***AN>MP (tukey $p \leq 0,05$).

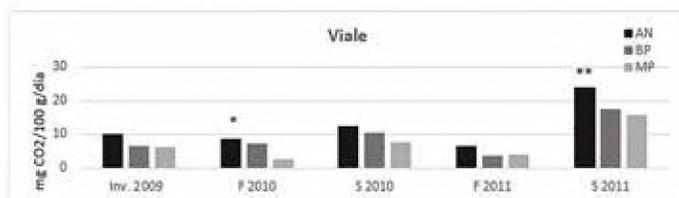


Figura N° 5. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Viale, en cada campaña de muestreo: *y**AN>MP (tukey $p \leq 0,05$).

En este ejemplo, la actividad respiratoria, cuantificada a partir del procedimiento presentado, sirvió para detectar muchas diferencias relacionadas al manejo agrícola en los diferentes sitios a través de los diferentes muestreos.

En la mayoría de las comparaciones hay una tendencia a ser el MP menor, como en el caso de Bengolea, que lo fue significativamente en F 2010. Así también, en la mayoría de las comparaciones, el AN es el mayor, como en Monte Buey, en Inv. 2009, con diferencia significativa. En este sitio también el BP mostró mayor valor en S 2011.

La situación del AN con mayor actividad respiratoria se puede corroborar en Pergamino, con diferencias con relación a los tratamientos con impacto agrícola. Situación similar se da en algunos muestreos en Viale. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del Programa de Áreas Estratégicas (2007-2011), Biología del suelo y producción agraria sustentable-Biospas de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (ANPCyT).

1.7.1.3. Ensayo de utilización de abonos orgánicos en producción hortícola

Se utilizaron muestras de suelo de un Hapludert típico, provenientes de un ensayo realizado en el marco de un proyecto de investigación en el que participaron la cátedra de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCyF-UNLP), el Inta

La Plata y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE. El ensayo se realizó en la localidad de Gorina, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires, en un sistema intensivo de producción hortícola bajo cobertura plástica y fertirriego por goteo.

Con la hipótesis de que la enmienda orgánica utilizada habitualmente por los productores del lugar, en general cama de pollo sin previo proceso de compostaje, producía efectos adversos a largo plazo, entendiéndose salinización, alcalinización, desbalance de nutrientes, y en búsqueda de alternativas superadoras que permitan mejorar las propiedades del suelo, se realizó el ensayo en cuestión y se compararon los siguientes tratamientos:

- T1: sin aplicación de enmiendas.
- T2: agregado de cama de pollo conforme se realiza en la región. Es decir, sin previo compostaje y en dosis aproximada equivalente a 30 y 40 tn/ha, que representa en volumen, 100 m³/ha.
- T3: agregado de compost de cama de pollo, en dosis correspondiente al contenido de materia orgánica del T2.
- T4: agregado de compost de cama de pollo, con doble dosis del T3.

Cada tratamiento contó con 4 repeticiones, obteniendo un total de 16 parcelas y se tomaron muestras a 2 profundidades: 0-15 cm (superficie) y 15-30 cm (profundidad). Conforme a lo mencionado, se trabajó con un total de 32 muestras.

Se realizaron 4 muestreos y se midió la respiración microbiana utilizando el método antes descripto. Se pudieron obtener los siguientes resultados:

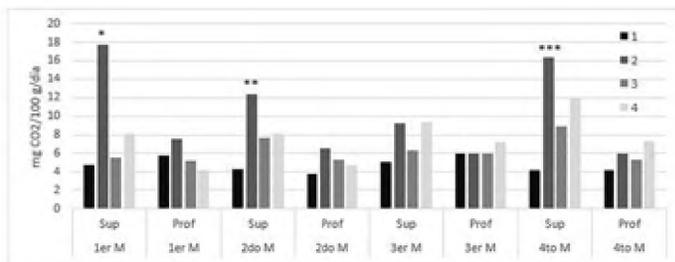


Figura N° 6. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en las diferentes profundidades de muestreo a lo largo de los cuatro muestreos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas para el T2 (tukey $p \leq 0,05$).

Si bien, en profundidad, las diferencias no fueron significativas, en superficie se detectó que en tres de los cuatro muestreos el T2 presentó mayor actividad microbiana, correspondiendo este tratamiento al uso de enmienda orgánica fresca sin compostaje previo, por lo que la actividad microbiana estaría más estimulada para la mineralización del mismo frente a los materiales estabilizados con el compostaje. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto Evaluación de enmiendas orgánicas sobre el suelo y cultivos hortícolas protegidos de la cátedra de Edafología de la FCAYF-UNLP y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

En resumen. Con la utilización de esta técnica para la determinación de la actividad respiratoria mediante la captación de CO₂, se han obtenido resultados en numerosos ensayos, donde se aplicaron diferentes prácticas de manejo agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPBELL, C.A, Brandt, S.A., Biederbeck, V.O., Zentner, R.P. y Schnitzer, M. (1992). «Effect of crop rotations and rotation phase on characteristics of soil organic matter in a Dark Brown Chernozemic soil». *Canadian Journal of Soil Science*, 72, 403-416.
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assensing soil quality». *En Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Special Publication, 35. EE.UU.: Soil Science Society of America.
- DORAN, J.W. y Zeiss, M.R. (2000). «Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality». *Applied Soil Ecology*, 15, 3-11.
- DORAN, J.W. (2002). «Soil health and global sustainability: translating science into practice». *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 119-127.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.

- GARCÍA IZQUIERDO, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T. y Trasar Cepeda, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- HERNÁNDEZ, T. y García, C. (2003). «Estimación de respiración microbiana del suelo». En García, C., Gil, S., Hernández, T. y Trasar, C. (eds.) *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos* (pp. 311-346). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- MARTÍNEZ, H., Fuentes, J.P. y Acevedo, H.E. (2008). «Carbono orgánico y propiedades del suelo». *Soil Science and Plant Nutrition*, 8(1), 68-96.
- KARLEM, d.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F. y Schuman, G.E. (1997). «Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation». *Soil Science Society America*, 61, 4-10.
- ÖHLINGER, R. (1996). «Soil respiration by titration». En Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. y Margesin, R. (eds.) *Methods in Soil Biology* (pp. 95-98). Berlín: Springer-Verlag.