



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad: PASANTÍA

Entrenamiento en la metodología de evaluación de actividad biológica en el suelo

PASANTE

José María RECALDE

ASESORA

Ing. Agr. Marcela Rosa COSSOLI

TRIBUNAL EVALUADOR

Ing. Agr. Tania S. REY MONTOYA

Ing. Agr. Gustavo A. GERZEL

Bioquímica (Dra.) Marina C. CARDOZO

AÑO

2019

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran en todos los ambientes naturales. En general, es el nivel y la naturaleza de los nutrientes disponibles, quienes determinan el nivel de crecimiento microbiano (Frioni, 2011).

Al considerar ambientes terrestres, nuestra atención se dirige casi indefectiblemente hacia el suelo y las plantas, porque es donde tienen lugar los procesos determinantes para el funcionamiento del ecosistema. El crecimiento microbiano más importante tiene lugar en la superficie del suelo, normalmente en la rizósfera. Incluso un pequeño agregado de suelo contiene microambientes muy diferentes (Madigan et al., 2004).

Las actividades de los microorganismos en este ambiente altamente heterogéneo, difieren drásticamente del comportamiento manifestado en medios clásicos de laboratorio. No actúan solos; otros microorganismos, la micro y mesofauna, la vegetación y las propiedades físicas y químicas del suelo y la acción del clima y del hombre, contribuirán a exaltar o inhibir un determinado proceso biológico (Frioni, 2011).

En términos de actividad biológica global, no interesa el estudio de grupos particulares de organismos de un ecosistema dado, muchas veces interesa conocer globalmente su actividad mediante el empleo de técnicas que evalúan la actividad de la micropoblación en su conjunto. Son técnicas comparativas empleadas para informar rápidamente sobre la potencialidad biológica de estos ambientes (Frioni, 2011).

El rol imprescindible que cumplen las poblaciones microbianas en los distintos ambientes, ya sean naturales o modificados por el hombre en búsqueda de satisfacer sus diversas necesidades, justifica la importancia del conocimiento de todas aquellas técnicas que nos permitan conocer su naturaleza y aquellos factores que inciden en su actividad.

Con la base de conceptos teóricos acerca de la actividad biológica de suelo, sumando la posibilidad de cuantificar sus parámetros en sitios específicos, lograremos alcanzar el objetivo de una producción sustentable utilizando de la mejor manera los recursos biológicos que nos brinda la naturaleza.

OBJETIVOS

- Adquirir experiencia en la metodología de evaluación de la actividad biológica del suelo, a partir del análisis de muestras tomadas en un ensayo a campo.
- Aprender a generar información y conclusiones a partir de un gran número de datos.
- Lograr la determinación de la influencia de distintas prácticas de manejo del suelo en la actividad biológica del mismo, integrando conocimientos adquiridos en la carrera.
- Fomentar mis capacidades para desenvolverse correctamente en un equipo de trabajo.

LUGAR DE TRABAJO

Los trabajos fueron realizados en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Ciudad de Corrientes Capital.

DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

En el desarrollo de la presente pasantía se realizó la evaluación de la actividad biológica de un suelo hortícola, para determinar los resultados de la aplicación de enmiendas orgánicas.

Los procesos o indicadores biológicos analizados fueron la actividad respiratoria, actividad celulolítica y actividad amonificante.

Con las determinaciones abordadas, se logró cuantificar tanto la actividad global de los microorganismos (respiración) como la de grupos fisiológicos específicos (celulólisis y amonificación).

Procedencia y acondicionamiento de las muestras de suelo

Se trabajó con muestras de suelo de un ensayo realizado en la localidad de Gorina, partido de La Plata (Buenos Aires), llevado a cabo en el marco de un proyecto en el que participan la cátedra de Edafología de la FCAYF (UNLP), el INTA La Plata y la cátedra de Microbiología agrícola de la UNNE. Fue realizado sobre un Hapludert típico, en producción hortícola intensiva bajo cobertura plástica y con sistema de fertirriego por goteo.

La hipótesis del ensayo era que la cama de pollo fresca utilizada como enmienda en producciones intensivas bajo cobertura, no mejoraba las características físicas y físico-químicas de los suelos, además de que a largo plazo aumenta la salinidad, alcalinidad y desbalance de nutrientes (en caso de no ajustar la dosis a los requerimientos del cultivo). Por ello, como objetivo general, el ensayo buscaba comparar los efectos de la aplicación de una enmienda orgánica fresca y otra estabilizada y compostada, sobre las propiedades del suelo,

Los tratamientos abordados en el ensayo fueron los siguientes:

- **Tratamiento 1** (Testigo, en adelante “T”), sin aplicación de enmiendas.
- **Tratamiento 2** (Cama de pollo fresca, en adelante “CP”), agregado de enmienda orgánica conforme se efectúa en la región (cama de pollo, dosis aproximada equivalente a $30\text{-}40 \text{ tn.ha}^{-1}$, que representa en volumen, $100 \text{ m}^3.\text{ha}^{-1}$).
- **Tratamiento 3** (Compost dosis productores, en adelante “CDP”), agregado de compost de cama de pollo, dosis correspondiente al contenido de materia orgánica del tratamiento CP.

- **Tratamiento 4** (Compost doble dosis, en adelante “CDD”), agregado de compost de cama de pollo, con doble dosis del tratamiento CDP.

Las muestras fueron tomadas tanto en superficie, de 0 a 15 cm, como en profundidad, entre los 15 y 30 cm. A su vez, cada tratamiento constaba de cuatro repeticiones, teniendo entonces un total de 32 muestras con las que se trabajaron en la pasantía.

Las muestras llegaron al laboratorio de Microbiología acondicionadas desde su lugar de origen: secas al aire, molidas, tamizadas (malla de 2 mm) y embolsadas, como se observa en la figura 1.



Figura 1: Muestras de suelo acondicionadas y embolsadas.



Figura 2: Detalle de muestra rotulada.

A modo de facilitar su identificación, se procedió a su rotulación (ver figura 2 y tabla 1) y fraccionamiento en bolsas de menor tamaño con el peso indicado para el procedimiento de cada determinación (figuras 3, 4 y 5).



Figura N° 3: Fraccionado de muestras.



Figura N° 4: Bolsitas con suelo tras el fraccionado.



Figura N° 5: Bolsitas con 30 gramos de suelo para cada determinación

Tabla 1: Rótulo de muestras, según numeración del laboratorio de microbiología.

Nº Muestra	Tratamiento	Repetición	Profundidad
1041	Testigo	R1	0 – 15
1042		R1	15 - 30
1043		R2	0 – 15
1044		R2	15 - 30
1045		R3	0 – 15
1046		R3	15 - 30
1047		R4	0 – 15
1048		R4	15 - 30
1049	Cama de pollo	R1	0 – 15
1050		R1	15 - 30
1051		R2	0 – 15
1052		R2	15 - 30
1053		R3	0 – 15
1054		R3	15 - 30
1055		R4	0 – 15
1056		R4	15 - 30
1057	Compost dosis productores	R1	0 – 15
1058		R1	15 - 30
1059		R2	0 – 15
1060		R2	15 - 30
1061		R3	0 – 15
1062		R3	15 - 30
1063		R4	0 – 15
1064		R4	15 - 30
1065	Compost doble dosis	R1	0 – 15
1066		R1	15 - 30
1067		R2	0 – 15
1068		R2	15 - 30
1069		R3	0 – 15
1070		R3	15 - 30
1071		R4	0 – 15
1072		R4	15 - 30

La modalidad de trabajo adoptada para todas las determinaciones fue ordenar las muestras en bloques, correspondientes a cada una de las repeticiones: bloque 1 con todos los R1, bloque 2 con los R2, y así sucesivamente. Es decir, se conformaron cuatro bloques de 8 muestras cada uno, 2 de cada tratamiento (una por cada profundidad de muestreo).

Esto permitió trabajar con un número razonable de muestras, dada la gran dificultad que representaría trabajar con las 32 muestras a la vez en cada determinación.

Además, cualquier variación o suceso que pudiera afectar a las muestras durante su incubación, sería “absorbida” por todos los tratamientos, manteniendo así la igualdad de condiciones.

DETERMINACIONES

A. ACTIVIDAD RESPIRATORIA

La respiración constituye un proceso redox de obtención de energía, donde los dadores de electrones pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos, pero los aceptores son por lo general inorgánicos (Frioni, 2011).

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. 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 compuestos orgánicos tales como 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 (Coyne 2000, Frioni 2011).

Debe considerarse que los microorganismos están sometidos a continuos cambios y para minimizarlos, regulan la actividad relativa de sus enzimas y, como consecuencia, microorganismos diferentes tienden a producir productos similares, en condiciones aerobias: material celular, agua y CO_2 . La cantidad de CO_2 producido depende del número y tipo de organismos presentes, de la naturaleza y cantidad de las fuentes de carbono oxidable, y está influenciada por la aireación, temperatura y reacción del suelo (Coyne 2000, Frioni 2011).

Método:

Determinación del desprendimiento de CO_2 en incubaciones aeróbicas de suelo.

Principio del método:

El suelo es incubado en un sistema aeróbico cerrado a 28 - 30 °C. El CO_2 producido es absorbido en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) que es posteriormente valorada por titulación (Ohlinger, 1996).

Materiales:

- Suelo: 30 g por muestra (seco al aire, molido y tamizado).
- Recipientes plásticos (bols) y elemento de mezcla (cuchara).
- Bolsitas de polietileno de 30 µm de espesor.
- Frascos de 270 – 300 ml.
- Hidróxido de sodio 0,5 N.
- Ácido clorhídrico 0,5 N.
- Bureta.
- Vasos de precipitados o Erlenmeyers, de 100 – 125 ml.
- Cloruro de Bario 2%.
- Fenolftaleína (indicador ácido - base).
- Algodón y alcohol (para desinfectar otros materiales, como cucharas).

Descripción de la técnica:

1) Humedecimiento: Se colocaron 30 g de suelo en un recipiente plástico y se agregaron gotas de agua con una pipeta Pasteur, mientras se removía con una cuchara, a modo de lograr la homogeneidad (figura 6).

La finalidad fue lograr una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (García Izquierdo et al., 2003). Es importante lograr un nivel de humedad que estimule la actividad microbiana pero manteniendo las condiciones de aerobiosis.



Figura 6: Detalle de suelo humedecido en recipiente plástico y cuchara para remover.

Se registró 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:

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

2) Armado de la cámara de incubación: Se cargaron en un frasco 40 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 N, con el objetivo de captar el CO₂ liberado por la muestra (figura 7).

La muestra de suelo humedecida se introdujo en una bolsita de polietileno de 30 micrones de espesor. Este material es permeable a los gases (CO_2 , O_2 , NH_3) e impermeable al vapor de agua.

La bolsita con suelo se colocó de tal forma que quedó 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 (figura 8).

Se prepararon, además, tres tratamientos “blancos”: frascos cargados con NaOH pero sin la bolsita con suelo. Procedimiento realizado con el fin de capturar y cuantificar el CO_2 circundante que no haya sido liberado por la muestra, descontarlo en el resultado final y así evitar la obtención de datos sobredimensionados.



Figura 7: Carga de frasco con NaOH 0,5 N.



Figura 8: Detalle de una cámara de incubación.

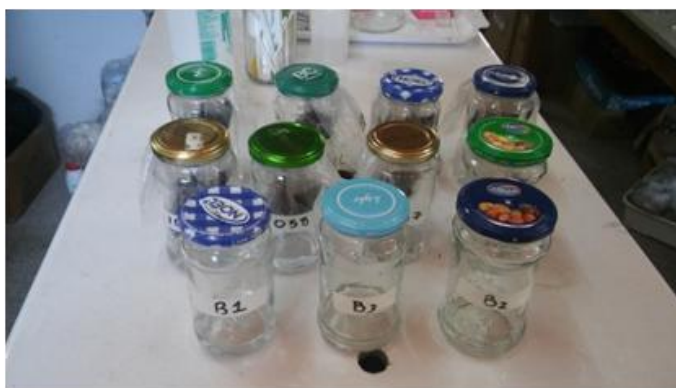
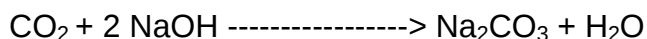


Figura 9: Cámaras listas para ser llevadas a incubación. Enfrente tres blancos, atrás ocho muestras de un bloque.

3) Incubación: Se llevaron las muestras a incubación en estufa a 28 – 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 cual justifica la relevancia del uso de la estufa para que todas las muestras estén sometidas a igual temperatura durante su incubación.

Durante la incubación, el CO₂ proveniente de la respiración microbiana, que circula dentro de este sistema cerrado, es captado por el NaOH formando carbonato de sodio (Na₂CO₃) y liberando agua, según se observa en la siguiente reacción química:



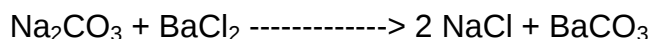
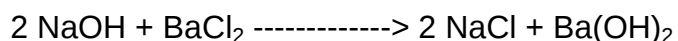
4) Titulación: Pasada la semana de incubación, se realizó la medición por retrovaloración de la captación de CO₂ en solución alcalina. Es decir, se evaluó la cantidad de NaOH que no reaccionó con el CO₂ mediante titulación con ácido clorhídrico, con fenolftaleína como indicador de pH.

La fenolftaleína es un indicador ácido-base, cuyo punto de viraje se encuentra en un valor de pH de 8,2, por debajo del cual es incoloro y por encima toma una coloración rosada o fucsia.

Se realizó una titulación por duplicado para cada muestra con ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N, para lo cual se tomaron dos alícuotas de 10 ml de cada frasco.

Se vertió cada alícuota en un vaso de precipitados de vidrio, se le agregaron dos gotas de cloruro de bario (BaCl₂) a fin de precipitar el carbonato de sodio formado, y unas gotas de fenolftaleína, que tornó color fucsia a la solución (figura 10).

Las reacciones químicas ocurridas en esta etapa son las siguientes:



Con el empleo de una bureta, se aplica gota a gota el HCl 0,5 N hasta que el indicador vire a incoloro y se registran los mililitros utilizados (figuras 11 y 12). Se titularon tanto las muestras como los tratamientos “blancos”.



Figura 10: Recipiente con alícuota, cloruro de bario y fenolftaleína.

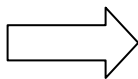


Figura 11: Detalle de la titulación.

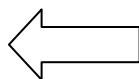


Figura 12: Alícuota titulada.

Los volúmenes utilizados en cada titulación se registraron en planilla, para su posterior conversión, por fórmula, en dióxido de carbono liberado.

5) Cálculos en gabinete: El CO₂ producido y liberado por la muestra se calculó por diferencia entre el título promedio de los blancos y el título promedio de cada una de las muestras (obtenidos a partir de la titulación de sus dos alícuotas).

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

Donde:

B: Promedio de los ml gastados en la titulación de los blancos.

M: Promedio de los ml gastados en la titulación de la muestra en cuestión.

N: Normalidad del ácido.

22: Peso equivalente del CO₂.

- 40: Mililitros del hidróxido de sodio cargados en el frasco.
 100: Gramos de suelo de referencia para la determinación.
 10: Mililitros de la alícuota titulada.
 P: Gramos de suelo colocados en la bolsita (30 gramos).

Resultados obtenidos

El siguiente gráfico expresa los valores promedio de los datos obtenidos en las cuatro repeticiones, para cada tratamiento y profundidad. Se obtuvo la liberación diaria de CO₂ dividiendo por 7 el resultado de la semana de incubación.

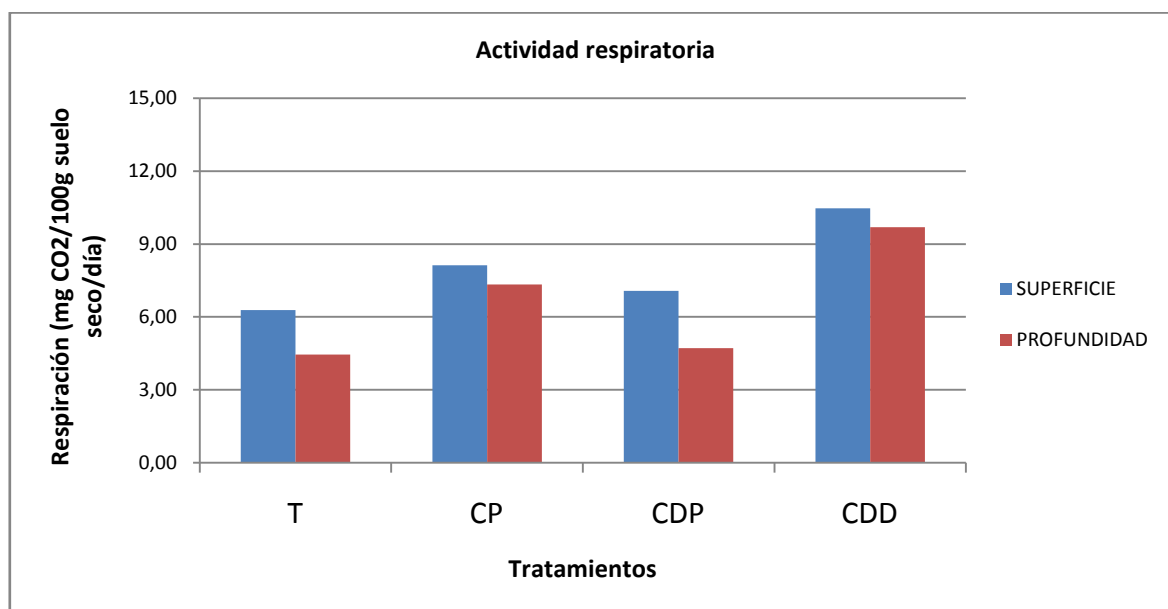


Gráfico 1: Actividad respiratoria de los diferentes tratamientos y profundidades, expresada en miligramos de dióxido de carbono liberados por 100 gramos de suelo seco por día. Referencias: T: Testigo, CP: Cama de pollo fresca, CDP: Compost dosis productores, CDD: Compost doble dosis.

El tratamiento CDD, que constaba de la aplicación de compost al doble de la dosis utilizada usualmente por los productores, liberó el mayor volumen de CO₂, expresando una mayor actividad microbiana global en ambas profundidades de muestreo.

Considerando la profundidad del muestreo, se reflejó una mayor actividad respiratoria en la parte superficial en todos los tratamientos.

Análisis estadístico

Las siguientes tablas expresan los resultados obtenidos con el análisis de varianza mediante el uso del software Infostat, con el método de comparación LSD Fisher y un nivel de significación de 0,05 (5%).

Tabla 2: Comparación de tratamientos, en superficie y en profundidad. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Tratamiento	Superficie CO ₂ liberado (mg/100g suelo/día)		Profundidad CO ₂ liberado (mg/100g suelo/día)	
T	6,29	A	4,45	A
CP	8,12	A	7,33	A B
CDP	7,07	A	4,72	A
CDD	10,48	A	9,69	B

En superficie, no existió diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos. En profundidad, el tratamiento CDD, manifestó una actividad respiratoria estadísticamente mayor que los tratamientos T y CDP.

Tabla 3: Comparación de profundidades dentro de cada tratamiento. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

	T		CP		CDP		CDD	
Superficie	6,29	A	8,12	A	7,07	A	10,48	A
Profundidad	4,45	A	7,33	A	4,72	A	9,69	A

Dentro de cada tratamiento, no existió diferencia significativa entre las dos profundidades de muestreo.

B. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

La celulosa, polisacárido constituido por unidades de glucosa, es uno de los constituyentes vegetales más importantes, representando un 15% del peso seco en leguminosas y gramíneas jóvenes, y más de un 50% en materiales leñosos. Sin embargo, los análisis de suelos indican que sólo representa una pequeña fracción (menos del 1%) de la materia orgánica.

La celulólisis, es el proceso mediante el cual la celulosa es hidrolizada por un complejo enzimático conocido como celulasa, presente en una variedad de bacterias, hongos y protozoos (Frioni, 2011).

La importancia agronómica del estudio de la descomposición de la celulosa, radica en que los rastrojos o residuos de cosechas, así como los excedentes de pastoreo, constituyen el principal aporte que puede efectuar el productor para mantener el nivel de materia orgánica del suelo.

La descomposición de restos vegetales de cualquier naturaleza se realiza entre dos extremos de potencial redox: condiciones aeróbicas, donde intervienen bacterias, actinomicetes, hongos, etc., y condiciones preponderantemente anaeróbicas, donde actúan exclusivamente las bacterias.

De la degradación de celulosa en medio aeróbico (condición analizada en la presente pasantía), se llega a la formación de biomasa microbiana, CO₂, H₂O, ácidos urónicos, entre otros, favorables para la estructuración del suelo.

Entre los factores más importantes que afectan este proceso, se encuentran: el nivel de nitrógeno y fósforo, temperatura, pH, humedad, aireación, proporción de lignina en el material vegetal (Coyne, 2000; Frioni, 2011).

Método

Evaluación de celulólisis mediante el empleo de microdiscos de papel de filtro en placa de tierra (Quant Bermúdez F.J., Bakos B. 1984).

Materiales:

- Suelo: 30 gramos por muestra (seco, molido y tamizado).
- Placas o cajas de Petri.
- Fuente de celulosa: Papel de filtro.
- Perforadora y tijera (para obtener los microdiscos de celulosa).
- Algodón y alcohol (para desinfectar otros materiales).
- Pinza histológica.

Descripción de la técnica

1) Obtención de microdiscos: Como fuente de celulosa para el desarrollo del método se emplearon discos de papel de filtro. Los microdiscos de celulosa se obtuvieron con el empleo de perforadora y tijera, depositándolos en un recipiente plástico y tratando de aprovechar la mayor cantidad de papel posible (ver materiales en la figura 13).

2) Preparación de placas: Se desinfectaron las placas con alcohol y se rotularon en su parte inferior. A continuación, se colocaron 30 gramos de suelo tamizado por placa y se niveló la superficie para lograr un mejor contacto con los microdiscos e igualdad de condiciones de humedad (figura 14).



Figura 13: Materiales para la obtención de microdiscos.



Figura N° 14: Placa con suelo seco y nivelado.

3) Humedecimiento: Con pipeta Pasteur, se aplicó agua gota a gota hasta lograr el humedecimiento correcto del suelo, tratando de lograr un 60% de la capacidad de campo. Esta operación reviste importancia para estimular la actividad microbiana pero manteniendo las condiciones aeróbicas del medio.

Se registraron los pesos seco y húmedo de cada muestra, que permitieron calcular el porcentaje de humedad de incubación.



Figura 15: Humedecimiento de suelo en placa con pipeta Pasteur.

4) “Siembra” de microdiscos: Se dispusieron sobre la superficie del suelo de la placa 50 microdiscos de papel con el empleo de la pinza histológica, logrando un íntimo contacto entre el papel y el suelo humedecido. Por placa se colocaron 127,8 mg de celulosa (peso promedio de 50 microdiscos), donde cada disco representó un 2% del total.

Para facilitar su control, resultó conveniente colocarlos en hileras, con un número de microdiscos conocido de cada una. En este caso, se dispuso una hilera central de 10 microdiscos, dos de 9, dos de 7 y dos de 4 en los bordes (figuras 16 y 17).



Figura 16: Disposición de la primera fila de discos sobre el suelo.



Figura 17: Detalle de placa con los 50 discos "sembrados".



Figura 18: Ocho placas correspondientes a un bloque con todos los discos sembrados.

5) Incubación: Las placas fueron apiladas en bloques de ocho y puestas en una bolsa con su correspondiente rótulo, y de esa forma fueron llevadas a incubación en estufa (figuras 19 y 20).



Figura 19: Bloque con ocho placas listo para ser llevado a incubar.



Figura 20: Detalle del bloque rotulado.

6) Control de placas: Se realizaron revisiones semanales durante 28 días. Es decir, las placas fueron inspeccionadas cuatro veces en intervalos de siete días. En cada revisión, se analizó y registró el nivel de degradación de cada disco, empleando la siguiente escala de grados de ataque:

- Sin atacar: Condición en la cual el disco se encuentra igual que al momento de la siembra, sin visualizarse degradación ni presencia de manchas o colonias microbianas.
- Parcialmente degradado: El disco presenta parte de su superficie degradada y/o con la presencia de manchas, sin llegar a su completa desaparición. Existe una pérdida parcial de su consistencia, que puede constatarse con el empleo de la pinza, pues el disco aún puede ser separado del suelo.
- Totalmente degradado: Se constata una pérdida total de consistencia, no pudiendo individualizarse al disco, que se confunde con el suelo y no se lo puede separar del mismo. En general queda reducido a una capa mucilaginosa, donde no se observa nada de papel.

Estos grados de ataque son sucesivos, desde el primero al tercero, pero no necesariamente llegan a evidenciarse los tres. En general, los discos presentaron una degradación parcial que avanzó con el correr de los días, y en las últimas revisiones cierta proporción de los discos de cada caja (excepcionalmente la totalidad) alcanzaron la degradación total, dependiendo del tratamiento del que provenía la muestra.

En cada revisión, en caso de ser necesario, se repuso el agua perdida en cada una de las placas de Petri, con el empleo de la pipeta Pasteur.

También se registraron otras características observables como la presencia de micelio, su volumen (bajo, medio, alto), su color, etc.

Resultados obtenidos

Los resultados promedio de las cuatro repeticiones se expresan en los siguientes gráficos, como porcentaje de degradación, siendo 50 microdiscos el 100%.

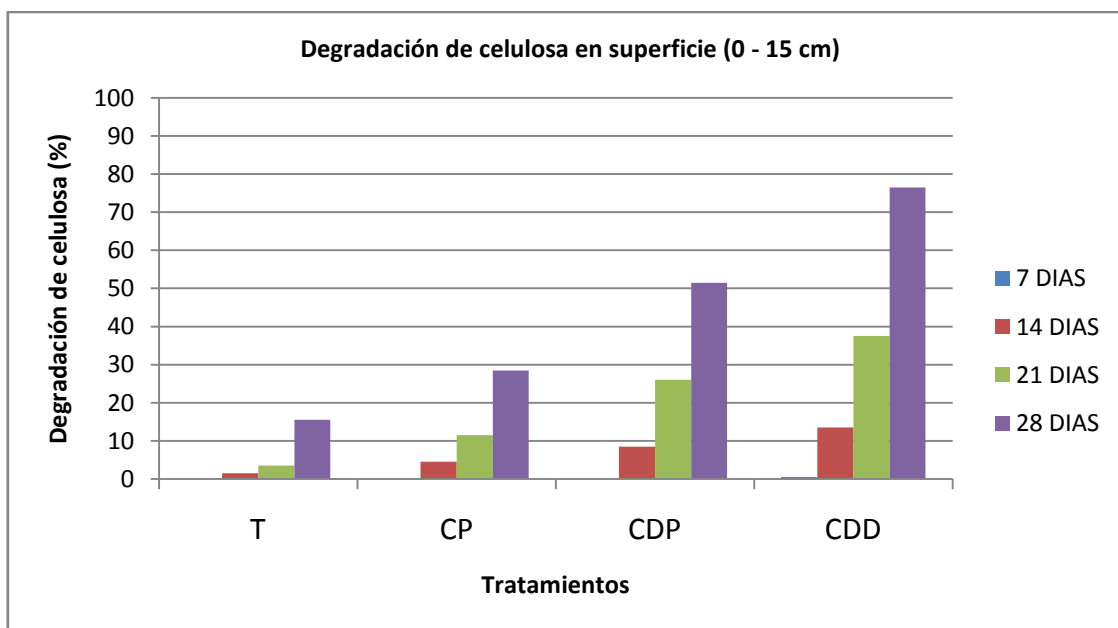


Gráfico 2: Porcentaje de degradación de celulosa de cada tratamiento a nivel superficial, observado en cada control semanal. Referencias: T: Testigo, CP: Cama de pollo fresca, CDP: Compost dosis productores, CDD: Compost doble dosis.

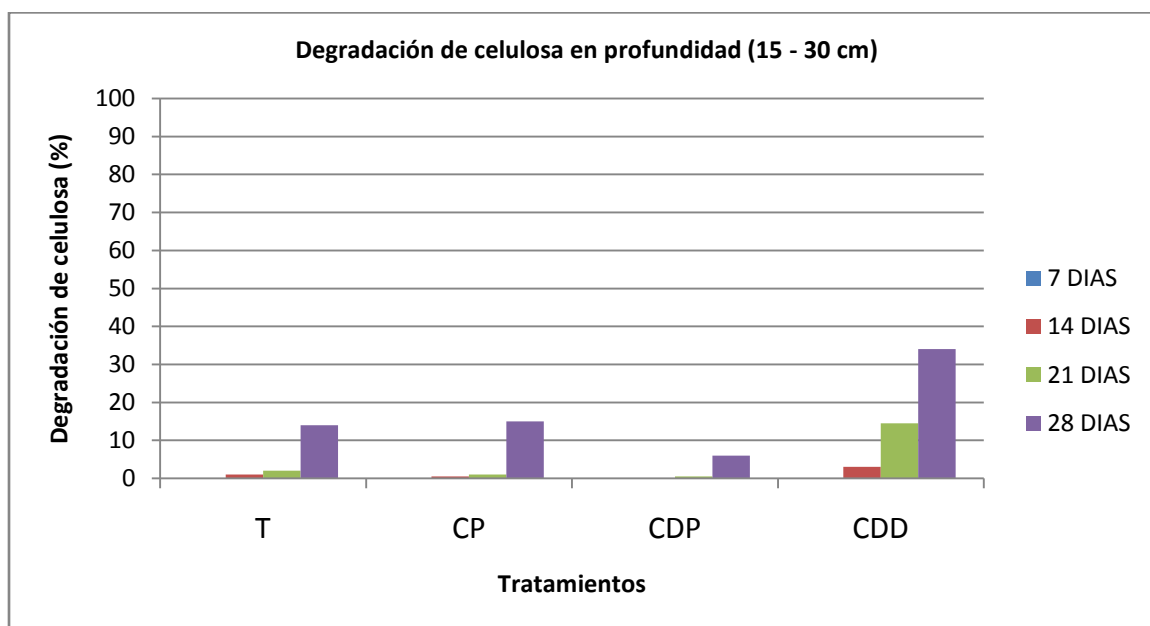


Gráfico 3: Porcentaje de degradación de celulosa observado en cada control semanal, en las muestras profundas de los tratamientos. Referencias: T: Testigo, CP: Cama de pollo fresca, CDP: Compost dosis productores, CDD: Compost doble dosis.

En los gráficos anteriores se advierte una mayor actividad celulolítica en el tratamiento CDD respecto al resto de tratamientos, desde la segunda hasta la última revisión y en ambas profundidades. De hecho, en superficie es el único tratamiento que manifestó degradación de celulosa en la primera semana.

Además, se observa la tendencia general de una mayor degradación de celulosa en las muestras superficiales de cada tratamiento.

Análisis estadístico

Las siguientes tablas expresan los resultados obtenidos con el análisis de varianza mediante el uso del software Infostat, con el método de comparación LSD Fisher y un nivel de significación de 0,05 (5%).

Se realizó considerando la degradación total alcanzada en la última revisión (28 días).

Tabla N° 4: Comparación de medias entre tratamientos superficiales y en profundidad. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Tratamiento	Superficie		Profundidad	
T	15,5	A	14,0	A B
CP	28,5	A	15,0	A B
CDP	51,5	A B	6,0	A
CDD	76,5	B	34,0	B

El tratamiento CDD tuvo la mayor actividad celulolítica, marcando diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos de menor celulólisis en ambas profundidades.

Tabla N° 5: Comparación de medias entre profundidades de cada tratamiento. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

	T		CP		CDP		CDD	
Superficie	15,5	A	28,5	A	51,5	A	76,5	A
Profundidad	14	A	15,0	A	6,0	A	34,0	A

No existió diferencia significativa entre las profundidades de cada tratamiento.

C. ACTIVIDAD AMONIFICANTE

El nitrógeno es un componente esencial para la nutrición de las plantas superiores y los microorganismos. La mayoría del nitrógeno en el suelo está bajo formas orgánicas, y sólo una pequeña fracción se encuentra en formas minerales utilizables directamente por las plantas y la flora microbiana, pudiendo así llegar a ser el factor limitante de los procesos biológicos del medio edáfico.

El proceso de mineralización del nitrógeno, ocurre fundamentalmente mediante dos procesos: la amonificación (cuya determinación se aborda en el desarrollo de la pasantía), proceso mediante el cual el nitrógeno orgánico es convertido en amonio bajo la acción de un elevado número de microorganismos heterótrofos; y la nitrificación, u oxidación del amonio liberado a nitrato, llevada a cabo fundamentalmente por bacterias autótrofas de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (García Izquierdo et al., 2003).

Del nitrógeno mineralizado en el suelo, con pocas excepciones el amonio es el principal producto de la reacción y no está confinado a unos pocos grupos de microorganismos, sino que es el típico y característico producto de excreción nitrogenado de la gran mayoría de ellos. La meso y macrofauna excreta ácido úrico; y los mamíferos úrea.

Debido a que la liberación de amonio es un fenómeno asociado con muchos organismos fisiológicamente diferentes, el nitrógeno es mineralizado en las condiciones más extremas, tanto el potencial redox, como de temperatura y niveles hídricos

El amonio, por reacciones bioquímicas en el suelo, tiene un destino múltiple; una parte es adsorbida por bases de intercambio o neutraliza los ácidos del suelo, otra es inmediatamente re-utilizada por múltiples microorganismos heterótrofos (con la condición de que tengan una sustancia carbonada energética aprovechable) quedando bajo la forma microbiana o fúngica; o bien si las condiciones son favorables, ser oxidado por los autótrofos a NO_2 y NO_3 , y a veces según las condiciones de formación y pH (7 o mayor) ser liberado a la atmósfera por volatilización (Coyne, 2000; Frioni, 2011).

Método

Determinación del desprendimiento de amonio en incubaciones aeróbicas de suelo.

Principio del Método

Está basado en la estimación de NH_3 desprendido durante la incubación del suelo en un sistema cerrado. El NH_3 es atrapado en una disolución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y posteriormente cuantificado por colorimetría con reactivo Nessler.

Este método está descrito en la literatura para la determinación de amonio en aguas residuales (AWWA, 1985). Por tal motivo, en el desarrollo de la presente pasantía, se colaboró con su estandarización para conseguir aplicarlo en la determinación de nitrógeno amoniacal liberado por una muestra de suelo en incubación aeróbica y capturado por una solución de ácido sulfúrico.

Reactivo Nessler

El reactivo Nessler (solución acuosa de tetraiodo mercuriato (II) de potasio en medio alcalino) es un reactivo químico utilizado para la determinación del nitrógeno amoniacal. Reacciona tomando una coloración amarilla o parda, en función de la concentración del amoníaco o del ión amonio (Vogel, 1976).

El color amarillo es indicador de bajas concentraciones de amoníaco (de 0,4 a 5mg/L). Se mide (con una sensibilidad aceptable) en la zona de longitudes de onda que va de 400 a 425nm, cuando se dispone de un recorrido de luz (cubeta) de 1cm.

Análisis espectrofotométrico

Los químicos han utilizado durante mucho tiempo el color para la identificación de sustancias químicas. La espectrofotometría se puede considerar como la extensión de la inspección visual en donde un estudio más detallado de la absorción de energía radiante por las especies químicas permite una mayor precisión en su caracterización y cuantificación (Day, 1999).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Díaz, 2000).

Curvas de calibración

Una curva de calibración es la representación gráfica de la relación de proporcionalidad existente entre la concentración de una sustancia y la señal analítica o respuesta que genera un instrumento. Tomando una serie de “patrones de calibración”, de los cuales se conoce la concentración del analito, se procede a su medición con el instrumento analítico bajo las mismas condiciones que las utilizadas posteriormente para los materiales de ensayo (de concentración desconocida). Una vez establecida la gráfica de calibrado, puede obtenerse la concentración de analito por interpolación (Miller y Miller, 2002).

Teniendo en cuenta lo expuesto en el párrafo anterior, en la pasantía se trabajó con una solución de sulfato de amonio 10 milimolar, a partir de la cual se obtuvieron los patrones de calibración o estándares con una concentración conocida de amonio. Tras la medición de su absorbancia en el espectrofotómetro, se obtuvo una curva de calibración que permitió calcular por interpolación la concentración de amonio de las muestras analizadas.

Obtención de estándares

Se decidió trabajar con una escala de siete estándares (numerados de 0 a 6), con cantidades crecientes de sulfato de amonio y una proporción constante del 10% de reactivo Nessler para todos.

Los pasos para su preparación fueron los siguientes:

- Se preparó la solución de sulfato de amonio 10 mM (milimolar), colocando 0,134 g de sulfato de amonio en 100 mL de agua, mediante el empleo de un matraz aforado.
- Se cargó agua y 1 ml de reactivo Nessler en siete vasos de precipitados.
- Se agregaron en los vasos anteriormente preparados, cantidades crecientes de la solución de sulfato de amonio, completando 10 ml de solución.

Tabla 6: Composición de los estándares:

	0	1	2	3	4	5	6
Amonio (mg/L solución)	0	0,95	1,9	2,85	3,8	4,75	5,7
Agua (ml)	9,000	8,975	8,950	8,925	8,900	8,875	8,850
Reactivo Nessler (ml)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Solución de sulfato de amonio (ml)	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Volumen final (ml)	10	10	10	10	10	10	10

Para lograr mayor exactitud, se prepararon tres bloques (A, B y C) de siete estándares, permitiendo generar así tres curvas de calibración y seleccionar aquella que presente el mayor R^2 para la posterior interpolación de datos.

Confección de curvas de calibración

Con el empleo del espectrofotómetro de la cátedra de Microbiología (figuras 21 y 22), se procedió a la lectura de absorbancia de los estándares de los tres bloques preparados.

En primer lugar, para poner a punto el aparato se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Prenderlo y esperar 15 – 20 minutos antes de empezar a medir.
- Poner en modo “Transmitancia”.
- Colocar una celda con agua y otra con un cuerpo negro.
- En la celda con agua, se debería obtener un valor de 100% de transmitancia, y entonces se aprieta el botón “100% T”.
- La celda con el papel negro debería arrojar el valor de 0% de transmitancia, y se aprieta entonces el botón “0% T”.

El fundamento de los dos pasos anteriores, es indicar o fijar en el aparato los límites de transmitancia.

- Por último, se aprieta el botón “MODE” para pasar del modo transmitancia (T) a Absorbancia (A), para iniciar las mediciones.



Figura 21: Espectrofotómetro BIOTRAZA 722 perteneciente a la Cátedra de Microbiología.



Figura 22: Detalle del interior del espectrofotómetro, donde se encuentran las cavidades para introducir las celdas.

Se cargaron 3 ml de cada estándar en las celdas del espectrofotómetro (figura 23), y se colocaron en la cavidad del aparato (figura 24).

Se inició con el estándar 0 y se siguió con la secuencia hasta llegar al estándar 6. Se realizó la lectura de absorbancia para cada estándar, cuyos valores se observan en la tabla 7.



Figura 23: Detalle de una celda cargada.



Figura 24: Celdas en las cavidades del interior del espectrofotómetro.



Figura 25: Detalle de los 3 bloques con 7 estándares cada uno.



Figura 26: Detalle de los 7 estándares del bloque C.

Tabla 7: Absorbancia medida con el espectrofotómetro de cada una de las repeticiones de los estándares.

ESTÁNDAR	BLOQUES		
	A	B	C
0	0,463	0,469	0,478
1	0,644	0,632	0,660
2	0,792	0,811	0,820
3	0,942	0,977	0,960
4	1,083	1,116	1,104
5	1,275	1,253	1,244
6	1,381	1,410	1,424

En la tabla 7 se observa un claro aumento de los valores de absorbancia cuanto mayor es la concentración del amonio del estándar analizado.

El siguiente paso fue realizar 3 gráficos lineales con cada una de las repeticiones (A, B y C), y obtener de cada uno de ellos (con el empleo de las funciones del software Excel) la línea de tendencia, el valor del coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación del gráfico.

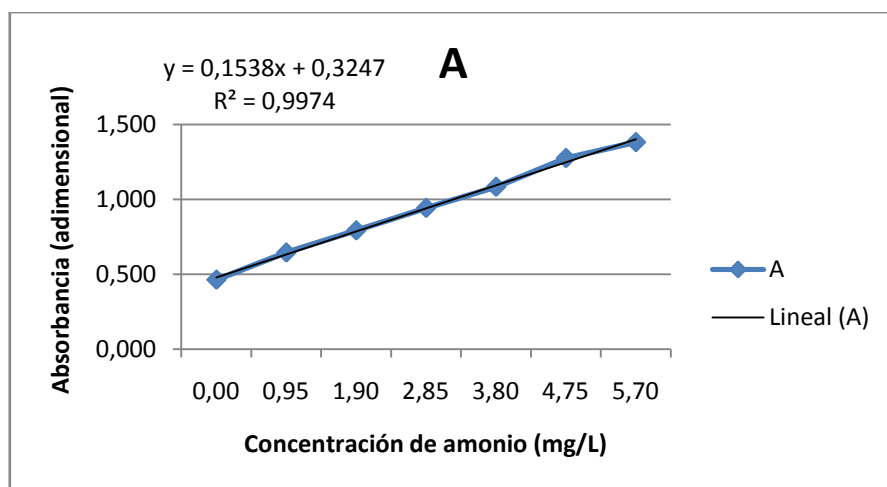


Gráfico 4: Absorbancia en función de la concentración de amonio. Estándares del bloque A.

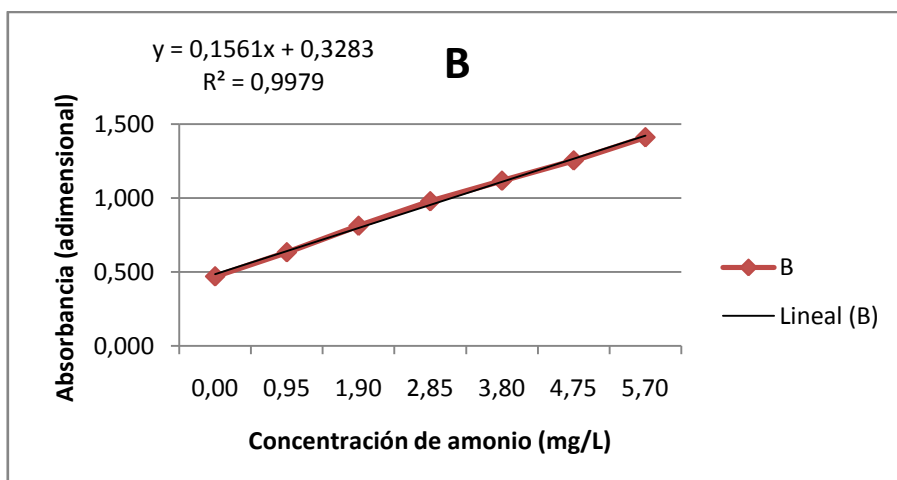


Gráfico 5: Absorbancia en función de la concentración de amonio. Estándares del bloque B.

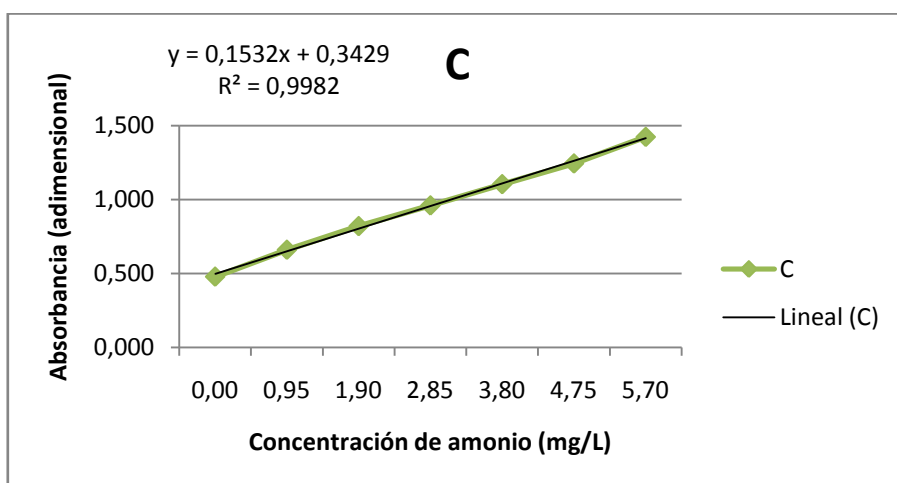


Gráfico 6: Absorbancia en función de la concentración de amonio. Estándares del bloque C.

El coeficiente de determinación se interpreta como la proporción de la variabilidad total en Y (variable dependiente) explicable por la variación de la variable independiente. Por ser una proporción, el coeficiente de determinación varía entre 0 y 1. Cuanto más próximo esté a 1, mayor valor predictivo tendrá el modelo en el sentido que los valores observables estarán muy próximos a la esperanza estimada por la regresión (Di Rienzo et al., 2005).

En vista de lo anterior, tener un valor de R^2 significativamente próximo a 1, implica que la variación de los valores registrados en la lectura de absorbancia del espectrofotómetro, están explicados (al menos en gran medida) por la variación en la concentración de amonio de los estándares.

Los valores de R^2 obtenidos en las 3 curvas oscilan entre 0,9974 y 0,9982, por lo cual la correlación entre las variables es alta. Se obtiene, pues, la ecuación de la

curva con R^2 más elevado (construida con los valores del bloque C) para su posterior empleo en las determinaciones:

$$Y = 0,1532X + 0,3429$$

Donde Y corresponde al valor de la lectura de absorbancia del espectrofotómetro (variable dependiente) y X a la concentración de amonio (variable independiente). Despejando la variable X, se obtendrán los valores correspondientes en ppm (mg/L) de amonio para cada muestra, a partir de los datos obtenidos con el espectrofotómetro.

Materiales:

- Suelo: 30 g por muestra (seco al aire, molido y tamizado).
- Recipiente plástico (Bols).
- Elemento mezclador (cuchara).
- Bolsitas de polietileno de 30 micrones de espesor.
- Pipetas (micro y macropipeta).
- Matraz aforado de 100 ml.
- Frascos de boca de cierre hermético, de 270 – 300 ml de volumen.
- Ácido sulfúrico 0,2 N.
- Reactivo de Nessler.
- Vasos de precipitados o Erlenmeyers.
- Espectrofotómetro BIOTRAZA 722.

Descripción de la técnica:

1) Humedecimiento: Procedimiento fue llevado a cabo de igual manera que para la determinación de actividad respiratoria.

Se colocaron 30 gramos de suelo en un recipiente plástico, y se aplicó agua gota a gota con el empleo de una pipeta Pasteur, hasta que se logró una humedad próxima al 60% de la capacidad de campo.

Se registraron en esta operación los pesos seco y húmedo de cada muestra.

2) Armado de la cámara de incubación: El suelo humedecido se introdujo en bolsitas de polietileno, que posteriormente se colocaron suspendidas dentro de frascos con 30 ml de ácido sulfúrico N/50 (0,02 N).

Las bolsitas, permeables al NH_3 , quedaron sostenidas con el cierre de la tapa del frasco y sin tocar la solución.

3) Incubación: Se llevaron los frascos preparados a estufa, a temperatura entre 28 – 30°, durante 7 días.

El objetivo fue que durante este período, el NH_3 liberado sea captado por el ácido del frasco, formando sulfato de amonio, según lo explica la siguiente reacción:



4) Determinación por espectrofotometría: Tras la semana de incubación, de cada frasco se tomó una alícuota de 18 ml y se la depositó en un vaso de precipitados, donde se la mezcló con 2 ml de reactivo Nessler (representando un 10% de la solución). Así se obtuvo una solución de 20 ml para cada muestra (figuras 27 y 28).



Figura 27: Recipientes con reactivo Nessler y su alícuota correspondiente.



Figura 28: Detalle de 2 muestras con reactivo y alícuota.

Como se explicó en párrafos anteriores, el espectrofotómetro debió ser encendido 15 – 20 minutos previos a su utilización.

Se realizaron lecturas por triplicado de cada muestra a partir de los 20 ml de solución obtenidos anteriormente.

Es importante destacar la limpieza y cuidado de las celdas del espectrofotómetro, puesto que no debe existir ningún tipo de interferencia para el aparato en la determinación de la absorbancia.

Las celdas fueron enjuagadas dos veces antes de cada determinación: primero con agua destilada, y luego con una fracción de la propia alícuota que iba a medirse. Esto con el objetivo de que el valor obtenido sea exclusivo de la muestra en cuestión, y no exista influencia alguna de muestras medidas anteriormente.

Tras realizar un correcto enjuague, se cargó la celda con la solución a determinar (volumen de 3 ml) y se la colocó en la cavidad donde el espectrofotómetro realiza la lectura.

Además, fue necesaria la preparación de tratamientos “blanco”.

A diferencia de lo descrito para la determinación de actividad respiratoria, no fue necesaria la incubación de un frasco vacío, puesto que en aquel caso era necesario eliminar de la consideración todo el CO_2 circundante no perteneciente a la respiración de la muestra.

En la determinación de actividad amonificante, no se busca cuantificar el amonio circundante (si existiese). El objetivo de la preparación del blanco es desestimar la coloración propia del Nessler, que toma incluso al mezclarlo sólo con agua destilada. Esa coloración amarilla, pese a ser tenue, debe ser excluida a la hora de trabajar con los datos de lectura de absorbancia, pues no se corresponde con una concentración determinada de amonio ni amoníaco (no deberían estar presentes en el agua destilada).

Por ello, el tratamiento “blanco” se preparó en el mismo momento de la determinación de actividad de amonificante de las muestras. Se cargó un vaso de precipitados con 9 ml de agua destilada y se le agregó 1 ml de reactivo Nessler. Se observó que la solución tomó una leve coloración amarilla.

Se registraron en planilla todos los valores arrojados por el dispositivo de lectura del espectrofotómetro (figura 29), para cada uno de los tratamientos.



Figura 29: Detalle de lectura de absorbancia arrojada por el espectrofotómetro.

Se realizó un promedio de los tres valores de cada muestra obtenidos anteriormente, obteniendo así un solo valor por tratamiento.

Cabe destacar que también se realizaron 3 lecturas para los 2 tratamientos blancos, y se realizó un promedio para cada uno (promedio de blancos).

5) Cálculos en gabinete: En la ecuación obtenida con la curva de calibración, se despeja la variable que se desea hallar (la variable X, partes por millón de amonio en solución), y el valor promedio de lecturas de absorbancia de cada muestra reemplaza a Y, permitiendo así conseguir el valor X:

Si

$$Y = 0,1532X + 0,3429$$

entonces

$$X = (Y - 0,3429) / 0,1532$$

Este paso se realizó tanto con los valores promedio de las muestras como para los blancos.

Entonces, al resultado obtenido para cada muestra, se le restó el valor de su correspondiente tratamiento blanco, por lo expuesto en párrafos anteriores.

Con esta operación se consigue, finalmente, obtener la concentración en mg/L de amonio en cada muestra.

Resultados obtenidos

El gráfico 7 expresa los resultados obtenidos en mg/L de amonio de cada tratamiento, tras la resta correspondiente del valor del blanco.

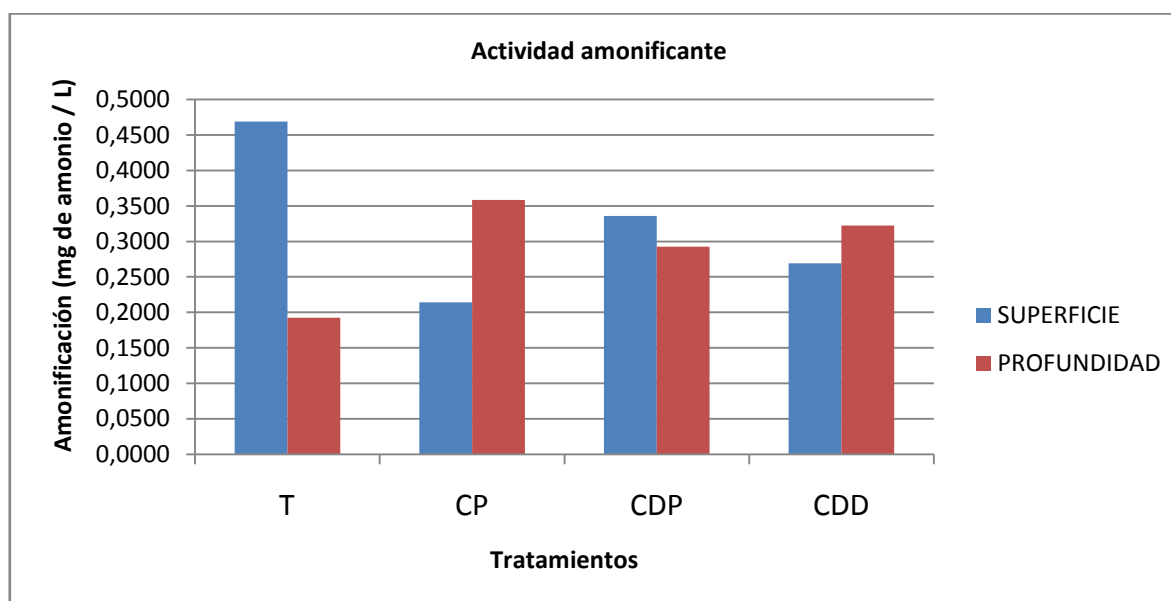


Gráfico 7: Actividad amonificante de los diferentes tratamientos y profundidades, expresada en mg/L de amonio. Referencias: T: Testigo, CP: Cama de pollo fresca, CDP: Compost dosis productores, CDD: Compost doble dosis.

Se puede observar un claro contraste entre lo acontecido en superficie y en profundidad. En el primer caso, el tratamiento T presentó una liberación de amonio claramente mayor que el resto.

En profundidad, por el contrario, el testigo fue el que menor actividad amonificante evidenció. Mientras tanto, los demás tratamientos tuvieron resultados similares, siendo superior al resto aquel en el que se utilizó cama de pollo sin compostar (CP).

En todo caso, no se evidenciaron diferencias significativas estadísticamente de ningún tipo, ya sea comparando tratamientos entre sí o profundidades dentro de cada tratamiento (LSD Fisher).

CONCLUSIONES

La aplicación de una enmienda compostada en el doble de la dosis habitualmente utilizada por los productores (tratamiento CDD) condujo a una mayor actividad respiratoria y celulolítica. Además, estos incrementos tuvieron lugar en ambas profundidades analizadas, sugeriendo de un enriquecimiento no sólo a nivel superficial sino también en profundidad.

El análisis de actividad amonificante según el método propuesto llevó a resultados llamativos. Ambos tratamientos donde se aplicaron enmiendas compostadas (CDP y CDD), mantuvieron un nivel amonificación intermedio y similar en ambas profundidades de muestreo.

Por el contrario, el testigo (T) obtuvo la mayor liberación de amonio en superficie y la menor en profundidad; mientras que ocurrió lo inverso con el tratamiento CP, manifestando ambas un comportamiento desigual para las profundidades en cuestión.

COMENTARIOS FINALES

Desde un punto de vista personal, haber tenido la oportunidad de trabajar en este proyecto ha resultado sumamente enriquecedor en mi formación como profesional.

Los objetivos propuestos al inicio de la pasantía se han cumplido de manera satisfactoria, logrando comprender la importancia que reviste la aplicación de enmiendas orgánicas en la estimulación de la actividad microbiana del suelo.

La determinación de los indicadores biológicos desarrollados, me permitió adquirir experiencia en lo referido a técnicas de laboratorio, como así también profundizar en ciertos conocimientos teóricos adquiridos en el transcurso de la carrera.

El desenvolvimiento en el equipo de trabajo ha resultado sencillo, teniendo en cuenta el respeto y la cordialidad con que se manejan los integrantes de la cátedra de Microbiología Agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

- **American Water Works Association (AWWA). 1985.** Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16a edition. Washington: American Public Health Association-American Water Works Association-Water Environment Federation.
- **Coyne, M. 2000.** Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo 416 p.
- **Day, R. A., Underwood, A. L., 1999.** Química analítica cuantitativa. Editorial Prince Hall. México.
- **Díaz N.A., Bárcena, J.A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez-Valdés, F.T., Túnez, I. 2000.** Espectrofotometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Facultad de Medicina, Córdoba, pp. 1-8.
- **Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Gonzales, L., Tablada, E., Díaz, M., Robledo, C., Balzarini, M. 2005.** Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Sexta edición. Editorial Brujas, Córdoba. 330 p.
- **Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzales, L., Tablada, E., Robledo, C., 2005.** Infostat versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **Frioni L., 2011.** Microbiología: básica, ambiental y agrícola. 1ª. ed. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. 786 p.
- **García Izquierdo, C., F. Gil Sotres, T. Hernández Fernández, C. Trasar Cepeda. 2003.** Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa, España.
- **Guía de trabajos prácticos. Microbiología agrícola. 2014.** FCA, UNNE.
- **Madigan, T. M., Martinko, J., Parker, J. 2004.** Brock Biología de los microorganismos. 10º Edición. Pearson Education. 1096 p.
- **Maureira Chicahual, J. 2013.** Producción de álcali por actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biofilm dental en niños de 8 años con distinta historia de caries dental. Universidad de Chile. Facultad de Odontología. Santiago, Chile.
- **Miller, J., Miller, J. 2002.** Estadística y quimiometría para química analítica. 4º edición. Editorial Pearson-Prentice Hall. Madrid, España. 286 p.
- **Miyares Estrada, M., Torres-Idavoy, D., Padrón-Morales, S., Valdés Hernández, J., Díaz Martínez, M., Bonilla Hernández, R. 2014.** Aplicación del reactivo de Nessler en la cuantificación de amonio para las fermentaciones de productos biotecnológicos. VacciMonitor. La Habana, Cuba.

- **Quant Bermudez J. F., Bakos B. 1984.** Empleo de microdiscos de papel de filtro para la evaluación de la celulólisis en placa de tierra granulada. Pub. Técnica Nº 1 Instituto Agrotécnico. F.C.A. UNNE. Resistencia, Chaco.
- **Shinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Masgesin, R. 1996.** Methods in soil biology. Berlin, Germany: Springer Verlag Eds. 426 p.
- **Vogel, A. I., 1976.** Química analítica cuantitativa. Editorial Kapelusz. Buenos Aires, Argentina.

OPINIÓN DEL ASESOR

El alumno José Recalde ha cumplido de forma excelente las actividades enmarcadas en su trabajo final de graduación modalidad pasantía.

Todas las determinaciones fueron realizadas en forma muy responsable y con una actitud proactiva a resolver cualquier circunstancia o repetición necesaria.

Se generaron instancias de debate en muchas oportunidades que fueron muy fructíferas tanto para él, como para mi crecimiento como asesora y habla de su curiosidad y sus ganas de profundizar en todos los análisis

Se involucró en el equipo de trabajo de la Cátedra de Microbiología Agrícola de forma muy fluida y además participó en otras actividades que se le requirieron y siempre con la mejor predisposición.

Ing. Agr. Marcela Cossoli

JTP Microbiología Agrícola

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por inculcarme desde niño la importancia de formarme como un profesional y apoyarme en ese transcurso.

A Daiana Hourcade, por ser mi compañera y sostén en todo momento, principalmente en las situaciones más difíciles.

A mi asesora, Marcela Cossoli, que desde el primer día me brindó su acompañamiento con la mejor predisposición para obtener un aprendizaje genuino de los trabajos realizados.

A todo el equipo de trabajo de Microbiología Agrícola, por su trato cordial y afectuoso que hacen a uno sentirse siempre a gusto al momento de trabajar.

A todos mis amigos y compañeros de la carrera, que de diferentes maneras me acompañaron y formaron parte de este trayecto.

José María Recalde