

Almacenamiento de muestras de suelo: incidencia sobre la cuantificación de biomasa microbiana

Daglio, G.; M. Sterren y S. Benintende

RESUMEN

La forma en que se conserva la muestra influye sobre la determinación de biomasa microbiana. Se evaluó el efecto de distintas formas de almacenamiento sobre el C y N de la biomasa microbiana (C-BM, N-BM) y sobre el cociente metabólico (qCO_2). Los tratamientos fueron: refrigeración a 4 °C, congelamiento a -12 °C (con posterior preincubación y sin ésta) y muestra fresca recién extraída. Los sitios muestreados fueron: rastrojo de soja (R), monte de eucaliptos (E), invernáculo hortícola (I), pastura (P) y monte nativo (M). Las repeticiones de cada sitio fueron tres. En R, I, P y M los tratamientos no ocasionaron variaciones en C-BM. La refrigeración a 4 °C no alteró los valores de N-BM ni el qCO_2 en R, I, P y M. Los coeficientes de correlación entre el C-BM y el N-BM de muestras frescas y muestras refrigeradas a 4 °C fueron de 0,65 y 0,94 respectivamente. La estimación del N inmovilizado a partir de N-BM de muestras refrigeradas a 4 °C tuvo una variación de $\pm 7\%$ respecto de las muestras frescas. Se concluyó que el almacenamiento de muestras a 4 °C es el más adecuado para medir C-BM y N-BM porque reflejan de mejor manera la condición del suelo sin almacenar.

Palabras clave: biomasa microbiana, cociente metabólico, conservación muestras de suelo.

Daglio, G.; M. Sterren y S. Benintende, 2005. Soil sample storage: its effect on microbial biomass quantification. Agriscientia XXII (2): 63-68

SUMMARY

Soil microbial biomass determination is affected by soil sample storage. The aim of this study was to evaluate the effect of storage techniques on microbial biomass carbon (C-BM), microbial biomass nitrogen (N-BM) and metabolic quotient (qCO_2). The treatments were: refrigeration at 4 °C, freezing at -12 °C and 7 days incubation, freezing at -12 °C without incubation and fresh sample. Three repetitions of five different sites: soybean straw (R), eucalyptus forest (E), pasture (P), horticultural greenhouse (I) and native forest (M) were sampled. The results showed that the storage technique did not affect the C-BM determination in four sites (R, P, I and M). Refrigeration at 4 °C did not modify the N-BM determination

Fecha de recepción: 16/06/05; Fecha de aceptación: 15/12/05

nor $q\text{CO}_2$ in R, I, P and M. Pearson correlation coefficients between fresh samples and samples refrigerated at 4 °C were 0.65 and 0.94 for C-BM and N-BM respectively. Immobilised N estimation from N-BM of samples refrigerated at 4 °C varied $\pm 7\%$ in relation to the fresh samples. We concluded that refrigerated storage at 4 °C was the most adequate storage method to determine C-BM and N-BM because it reflects natural soil condition.

Key Words: microbial biomass, metabolic quotient, soil sample conservation

G. Daglio, M. Sterren y S. Benintende. Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER. CC 24 3100 Paraná, Entre Ríos, Argentina. (silviab@fca.uner.edu.ar)

INTRODUCCIÓN

Para garantizar una agricultura sustentable es importante el monitoreo del suelo a través de variables químicas, físicas y/o biológicas (Stenberg *et al.*, 1998) que reflejan el impacto de las prácticas agrícolas y se convierten en indicadores de sustentabilidad. Bollero (2000) destaca a los parámetros biológicos porque son los más sensibles y por ello se consideran buenos indicadores.

La determinación de la biomasa microbiana es primordial ya que es el catalizador primario de procesos biogeoquímicos y forma parte de la reserva nutritiva y energética del suelo; es un componente lábil de la materia orgánica y constituye aproximadamente el 3% del C y el 5% del N total (Smith & Paul, 1990).

Si no es posible trabajar con muestras frescas, las condiciones de almacenaje son decisivas al medir propiedades biológicas, porque en la muestra colectada se genera un nuevo ambiente al cambiar algunas condiciones (temperatura, oclusión de la materia orgánica, variación de la humedad, etc.), y se crean nuevos límites a la densidad y actividad de los microorganismos.

Los métodos más comunes de almacenamiento utilizados en algunos laboratorios de suelo son el secado al aire o, para algunas determinaciones, la conservación en frío o la congelación.

El secado al aire provoca que los microorganismos sensibles mueran o queden en estados de reposo o resistencia (Tate, 2000); esa reducción es proporcional a la duración del período de almacenaje, y también hay un efecto de cambio en la composición de la comunidad (Sparling & Cheshire, 1979).

La rehumectación e incubación por períodos de 7 a 15 días para restablecer la población original es una alternativa, aunque cuestionada por algunos autores. Patern *et al.* (1980) observan que este tratamiento aumenta la desnitrificación. Gonçalves *et al.* (2002) describen efectos diferentes en el C-BM y la actividad respiratoria en relación al tiempo de incubación luego de la rehumectación.

Por esta razón, los métodos de almacenaje más comúnmente utilizados en análisis microbiológico son el frío y la congelación. Éste podría causar daños por la formación intracelular de cristales de hielo que maten a los organismos sensibles y provoquen una disminución de la actividad microbiana (Mac Leod & Calcott, 1976). Por el contrario, los cambios estructurales en la muestra debido a la rotura de los agregados por el congelamiento pueden derivar en una mayor estimación de la biomasa y actividad microbiana. Estos dos efectos opuestos podrían compensarse mutuamente. Debido a los efectos que ocasiona esta forma de almacenamiento, cuando se utiliza el congelamiento se realiza frecuentemente, antes del análisis, una preincubación de la muestra a temperatura y humedad óptima para reestablecer la población de microorganismos (Horwath & Paul, 1994).

En las muestras de suelo refrigeradas generalmente hay un lento agotamiento del sustrato disponible, debido a la escasa actividad microbiana (Coxson & Parkinson, 1987).

Ross (1991) no encontró reducción significativa de la biomasa analizada por los métodos de fumigación con cloroformo y extracción (CFE) o fumigación con cloroformo e incubación (CFI) en períodos de tres meses de conservación de muestras refrigeradas. Sin embargo, en este mismo trabajo Ross in-

dica que hay un 41% de reducción de biomasa después de 14 meses a 4 °C, así como también una reducción similar de la respiración basal. Por otra parte, Stenberg *et al.* (1998) encontraron que la biomasa estimada por CFE mostró una severa disminución durante los primeros tres meses de refrigeración pero fue mucho menos afectada congelándola. El trabajo de Faccendini *et al.* (2003) mostró que el almacenaje de muestras de suelo por congelamiento no afecta el C-BM pero sí al N-BM medido por CFI en distintos tipos y usos de suelo.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del almacenamiento por refrigeración y por congelación sobre el C y el N de la biomasa microbiana del suelo y sobre el cociente metabólico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelo y tratamientos

Se tomaron tres muestras de suelo, compuestas por quince submuestras cada una, de los primeros 0,10 m en cada uno de los cinco sitios evaluados. Los sitios muestreados fueron: rastrojo de soja (R), monte de eucaliptus (E), invernáculo hortícola (I), pastura polifítica de alfalfa, trébol rojo y cebadilla de tercer año (P) y monte nativo (M). El sitio de monte nativo corresponde a un suelo arenoso (Entisol) y los otros cuatro sitios corresponden a suelos franco arcillo limoso (Molisolos) con diferentes niveles de materia orgánica.

Se seleccionaron sitios con diferentes tipos de suelo y manejos, que modifican la biomasa microbiana, y por la cercanía al laboratorio para realizar las determinaciones de las muestras frescas el mismo día del muestreo.

Las muestras fueron homogeneizadas y se separaron en cinco porciones. En una se determinó en forma inmediata el carbono de biomasa microbiana (C-BM) y el nitrógeno de la biomasa microbiana (N-BM); a este tratamiento se lo denominó muestra fresca. Otra porción fue almacenada en heladera a 4 °C por 7 días, a la que posteriormente se le realizaron las determinaciones antes mencionadas, y se la denominó refrigeración a 4 °C. Otras dos fueron congeladas a -12 °C por un mes, y una de ellas fue preincubada por 7 días a temperatura de 28 °C, de acuerdo a lo sugerido por Howard y Paul (1994), para luego repetir las determinaciones antes mencionadas; este tratamiento se denominó congelado (-12 °C) y preincubado. A la otra porción congelada se le realizaron las determinaciones directamente, a la que se le llamó tratamiento de congelado (-12 °C). La quinta porción fue secada al aire, molida y tam-

zada por 0,5 mm para determinar carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (Nt) y pH del suelo.

En la Tabla 1 se presenta una caracterización de los sitios muestreados en cuanto a contenidos de C orgánico, N total, relación C/N y pH.

Técnicas analíticas

El C-BM fue determinado por el método de fumigación-incubación de Jenkinson y Powlson (1976), utilizando un k_c de 0,45 (Jenkinson & Ladd, 1981; Ferrari *et al.*, 1997). Se calculó el cociente metabólico (qCO_2), que es la cantidad de CO_2 respirado por unidad de masa microbiana en un determinado tiempo, haciendo la relación entre la respiración, medida en las muestras no fumigadas durante el período de incubación (diez días) y el C-BM. Para la determinación de N-BM se utilizó la técnica de fumigación-incubación descrita por Shen *et al.* (1984) con un k_n de 0,68 (Ferrari *et al.*, 1997).

Se determinó el COT por Walkley y Black, Nt por Kjeldahl y pH en agua (relación 1:2.5) (Jackson, 1976).

El N inmovilizado (N contenido en los microorganismos, expresado como fracción del peso de una hectárea de suelo de 0,10 m de profundidad) se calculó a partir del N-BM, utilizando un valor de densidad aparente promedio de 1,2 $Mg\ m^{-3}$ de suelo, en los horizontes superficiales de textura franco-arcillo-limoso (R, E, I y P). Para el horizonte superficial del suelo arenoso (M) el valor de densidad aparente considerado fue 1,4 $Mg\ m^{-3}$ de suelo (Pilatti, 1997; comunicación personal).

Análisis estadístico

Se realizó ANOVA y comparación de medias mediante LSD ($\alpha=0,05$).

Se hicieron correlaciones lineales en C-BM y N-BM de las muestras ($n = 15$) antes y después de las distintas alternativas de almacenaje.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se observa que las variaciones entre el C-BM medido de las muestras con almacenamiento y sin éste no fueron significativamente diferentes, a excepción del sitio E, donde el C-BM disminuyó entre el 43% y 47% en todos los casos. El análisis de correlación entre el C-BM de las distintas alternativas de conservación y el C-BM de las muestras frescas mostró valores de r de 0,65*, 0,67* y 0,76** para el tratamiento de refrigeración a 4 °C, congelado a -12 °C y congelado a -12 °C y preincubado, respectivamente. Las correlaciones encon-

Tabla 1: Contenidos de C orgánico, N total, relación C/N, pH de los suelos en los sitios muestreados.

SITIOS MUESTRADOS	COT (g C 100 g ⁻¹)	N total (g N 100 g ⁻¹)	Relación C/N	pH (1:2,5)
Rastrojo de soja (R)	1,69	0,17	10,06	7,0
Monte de eucaliptos (E)	1,40	0,13	10,43	5,4
Invernáculo hortícola (I)	1,88	0,18	10,45	7,7
Pastura de 3 ^{er} año (P)	1,87	0,20	9,58	6,1
Monte nativo (M)	0,12	0,03	3,90	6,4

Tabla 2: Carbono de la biomasa microbiana (C-BM) de los suelos en los sitios muestreados sometidos a diferentes tratamientos de almacenamiento.

SITIOS MUESTRADOS	Carbono de la Biomasa Microbiana C-BM ($\mu\text{gC g}^{-1}$ de suelo)			
	Muestras frescas	Refrigeración (4 °C)	Congelado (-12 °C)	Congelado (-12 °C) + preincubación
Rastrojo de soja (R)	544,2 a	618,8 a	612,7 a	696,8 a
Monte de eucaliptos (E)	438,5 a	249,8 b	237,1 b	232,3 b
Invernáculo hortícola (I)	373,4 a	292,9 a	521,8 a	306,9 a
Pastura de 3 ^{er} año (P)	712,2 a	601,2 a	754,5 a	658,9 a
Monte nativo (M)	183,9 a	231,2 a	129,7 a	239,5 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas dentro de la fila para un $\alpha = 0,05$.

tradas y la constancia en los valores de C-BM antes y después del almacenaje, en la mayoría de los sitios, indican que cualquiera de los métodos de almacenamiento podría ser utilizado para la determinación de esta variable.

En el presente trabajo se encontraron resultados similares a los presentados por Ross (1991), quien muestra que no hay una reducción significativa del C-BM por el método CFI en muestras congeladas y refrigeradas por cortos períodos de tiempo respecto de los valores encontrados en muestras frescas. Stenberg *et al.* (1998) trabajaron con doce suelos agrícolas de texturas variadas y encontraron que el congelamiento a -20 °C por períodos largos de almacenamiento (14 meses) fue mejor que la refrigeración a 2 °C para los análisis microbiológicos aplicados, entre los que se menciona la medición de biomasa microbiana.

En el E se registró un descenso en los valores de C-BM en todos los métodos de conservación, a diferencia de los otros sitios muestreados, probablemente debido a diferencias en las características de la materia orgánica y el pH. Esto coincide con lo hallado por Faccendini *et al.* (2003), quienes afirman que, en este tipo de suelos, los residuos orgánicos de eucalipto contienen cantidades importantes de aceites esenciales y otros compuestos que modifi-

can la relación C/N de la población microbiana en las muestras sometidas a congelamiento y preincubación.

El tratamiento refrigerado a 4 °C no generó variaciones en los $q\text{CO}_2$ excepto en E donde todos los métodos de conservación provocaron un marcado incremento en esta variable (Tabla 3). El congelamiento a -12 °C y preincubación generó descensos en esta variable en tres sitios (R, I, y M). La constancia entre los valores de $q\text{CO}_2$ en el suelo fresco y refrigerado a 4 °C, denotan que este método de conservación es el que provoca menores variaciones en la actividad de microorganismos. Debe destacarse que el tiempo de conservación de las muestras refrigeradas a 4 °C, empleado en este trabajo, no fue lo suficientemente largo como para ocasionar agotamiento del sustrato disponible para la actividad de los microorganismos, como lo plantean Coxson y Parkinson (1987).

En la Tabla 4 se observa que en el tratamiento congelado a -12 °C y preincubación, tres de los sitios (R, I y P) presentaron diferencias significativas con la medición realizada en muestras frescas, en las que se observó un aumento promedio del 30% en el contenido de N-BM. Efecto similar, aunque de mayor magnitud, fue hallado por Faccendini *et al.* (2003), quienes encontraron que el congelado a -12

°C con una posterior pre incubación provocó que el N-BM aumente y presente diferencias de aproximadamente 90% con respecto al N-BM medido en el suelo fresco. En E y M el N-BM no presentó diferencias significativas con las muestras frescas. Estos autores también evaluaron un monte de eucaliptus que tuvo un comportamiento similar al que se observa en este trabajo.

No se observaron diferencias significativas con el suelo fresco en el tratamiento de refrigeración a 4 °C en todos los sitios. Además, la alteración en el contenido de N-BM fue muy baja, variando desde un aumento del 6% en M hasta una disminución del 7% en I.

Los valores de coeficientes de correlación para el N-BM entre los distintos tratamientos de almacenaje y las muestras frescas fueron: 0,94**, 0,94** y 0,98** para los tratamientos de refrigeración a 4 °C, congelado a -12 °C y congelado a -12 °C y preincubación, respectivamente.

Se calculó el N inmovilizado en la biomasa microbiana para 0,10 m de profundidad, en muestras

frescas y después del almacenamiento refrigerado a 4 °C; los resultados se observan en la Tabla 5.

Los resultados muestran en todos los sitios una variación menor al 7%, por lo que el tratamiento refrigerado a 4 °C fue el más adecuado para determinar N de la masa microbiana por el método de fumigación incubación.

CONCLUSIONES

El efecto de los métodos de almacenamiento de las muestras no fue igual en todos los suelos y manejos estudiados, ni para las variables evaluadas.

Los valores de C-BM determinados en las distintas alternativas de almacenamiento no presentaron diferencias significativas con los valores encontrados en las muestras frescas, excepto en monte de eucaliptus en el que se observó disminución significativa en todos los tratamientos.

La correlación entre el N-BM medido en un suelo fresco y refrigerado a 4 °C fue de 0,94.

La estimación del N inmovilizado a partir de N-

Tabla 3: Cociente metabólico de los suelos de los sitios muestreados sometidos a diferentes tratamientos de almacenamiento.

SITIOS MUESTREADOS	qCO ₂ (µgCO ₂ /µg de C-BM/h) (x10 ⁻⁴)			
	Muestras frescas	Refrigeración (4 °C)	Congelado (-12 °C)	Congelado (-12 °C) + preincubación
Rastrojo de soja (R)	13,1 a	14,6 a	11,0 a	7,7 b
Monte de eucaliptos (E)	12,2 b	32,1 a	32,4 a	28,4 a
Invernáculo hortícola (I)	17,1 a	18,0 a	25,1 a	8,0 b
Pastura de 3 ^{er} año (P)	8,83 ab	10,5 a	11,7 a	6,0 b
Monte nativo (M)	12,7 b	8,9 bc	43,6 a	4,0 c

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas dentro de la fila para un $\alpha = 0,05$.

Tabla 4: Nitrógeno de la biomasa microbiana (N-BM) de los suelos en los sitios muestreados sometidos a diferentes tratamientos de almacenamiento.

SITIOS MUESTREADOS	Nitrógeno de la Biomasa Microbiana N-BM (µg N g ⁻¹ de suelo)			
	Muestras frescas	Refrigeración (4 °C)	Congelado (-12 °C)	Congelado (-12 °C) + preincubación
Rastrojo de soja (R)	104,18 b	103,74 b	102,99 b	132,21 a
Monte de eucaliptos (E)	43,11 a	45,73 a	29,01 b	35,86 ab
Invernáculo hortícola (I)	57,75 b	53,68 b	66,87 ab	74,41 a
Pastura de 3 ^{er} año (P)	104,47 b	99,15 b	128,92 a	137,46 a
Monte nativo (M)	30,18 a	28,81 a	24,99 a	24,03 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas dentro de la fila para un $\alpha = 0,05$.

Tabla 4: Nitrógeno (N) inmovilizado en la biomasa microbiana en las muestras frescas y en las muestras refrigeradas (4 °C).

SITIOS MUESTREADOS	MUESTRAS FRESCAS	REFRIGERACIÓN (4 °C)	VARIACIÓN
	N (kg N ha ⁻¹)	(kg N ha ⁻¹)	(%)
Rastrojo de soja (R)	125,02	124,48	-0,4
Monte de eucaliptos (E)	51,73	54,88	6,1
Invernáculo hortícola (I)	69,30	64,42	-7,0
Pastura de 3 ^{er} año (P)	125,36	118,98	-5,1
Monte nativo (M)	36,22	34,57	-4,6

BM de muestras refrigeradas a 4 °C tuvo una variación de \pm 7% respecto de las muestras frescas.

La refrigeración a 4 °C resultó la técnica más conveniente de almacenamiento cuando se requieren determinaciones de C y N de biomasa microbiana y estimaciones de $q\text{CO}_2$ en muestras de suelo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la FCA-UNER.

BIBLIOGRAFÍA

- Bollero, G., 2000. Soil Quality Assessment. Actas del XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Argentina. (CD-ROM)
- Coxson, D. and D. Parkinson, 1987. Winter respiratory activity in aspen woodland forest floor litter and soils. *Soil Biol. Biochem* 19: 49-59.
- Faccendini, N.; M. Benintende y S. Benintende, 2003. Biomasa microbiana del suelo: almacenaje de muestras en freezer. Actas de la IV Reunión Nacional Científico Técnica de Biología de Suelos IV Encuentro de Fijación Biológica de Nitrógeno. Santiago del Estero, Argentina. (CD-ROM)
- Ferrari, J.; F. García y H. Etcheverría, 1997. Evolución de carbono y del nitrógeno de la biomasa microbiana durante el desarrollo del cultivo de trigo. *Ciencia del Suelo*, 15(2): 64 -70.
- Goncalves, A.; M. Monteiro; J. Guerra and H. De Polli, 2002. Microbial biomass in air dried and rewetted soil samples. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 37: 651-658.
- Horwath, W. and E. Paul, 1994. Microbial Biomass, in *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties*. Weaver, W. et al. SSSA Book Series Nº5, USA, pp.735-772.
- Jackson, M., 1976. *Análisis químico del suelo*. Ediciones Omega. Barcelona, 662 pp.
- Jenkinson, D. and P. Powlson, 1976. The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem* 8: 209-213.
- Jenkinson, D. and J. Ladd, 1981. Microbial Biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biol. Biochem* 5: 415-471.
- MacLeod, R. and P. Calcott, 1976. Cold shock and freezing damage to microbes, in *The Survival of Vegetative Microbes*. Gray T., J. Postgate. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 81-109.
- Patern, D.; J. Bremner and A. Blackmer, 1980. Effects of drying and air drying storage of soils on their capacity of denitrification of nitrate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 67-70.
- Ross D., 1991. Microbial biomass in a stored soil: a comparison of different estimation procedures. *Soil Biol. Biochem* 23: 1005-1007.
- Shen, S.; G. Pruden and D. Jenkinson, 1984. Mineralization and immobilization of nitrogen in fumigated soil and the measurement of microbial biomass nitrogen. *Soil. Biol. Biochem* 16: 437 - 444.
- Smith, J. and E. Paul, 1990. The significance of soil microbial biomass estimations, in: *Soil Biochemistry*. Bollag, J. and G. Stotzky. Marcel Dekker, New York. pp. 357-396.
- Sparling, G. and M. Cheshire, 1979. Effects of soil drying and storage on subsequent microbial growth. *Soil Biol. Biochem* 11: 317-319.
- Stenberg, B.; M. Johansson; M. Pell; K. Sjö Dahl-Svensson; J. Stenstrom and L. Tortensson, 1998. Microbial biomass and activities in soil as affected by frozen and cold storage. *Soil Biol. Biochem* 30 (3): 393 - 402.
- Tate, R., 2000. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons. USA. pp. 508.