

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA EN SUELOS ALTOANDINOS DEL PERÚ

Pérez, W.E.^{1*}; Rolando, J.L.²; García, S.J.¹

(1) Departamento Académico de Suelos, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima 12, Perú.

(2) International Potato Center (CIP), Apartado 1558, Lima 12, Perú.

wperezp@lamolina.edu.pe, Av. La Molina s/n, La Molina. Lima 12. (+51)(1)980665278

RESUMEN

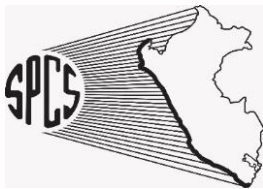
El carbono de la biomasa microbiana (Cbio) es un indicador muy empleado en la evaluación de calidad del suelo. La biomasa microbiana es una reserva de nutrientes y una fracción muy lábil que fluctúa con la estación y que responde rápidamente a los cambios de manejo del suelo. Se propone la implementación de un analizador de carbono, que utiliza oxidación catalítica por combustión y detección infrarroja, para una determinación rápida, segura y ecológica del Cbio. Se compararon los resultados de métodos tradicionales, Walkley-Black (CbioW) y Fumigación-Incubación (CbioI), que se contrastaron con el del analizador (CbioS). Se utilizaron suelos pertenecientes a los Andes Centrales de Perú con diferentes usos actuales de tierra de provincias de Junín y Yauri, departamento de Junín. Se obtuvo una correlación positiva del CbioS y CbioI, con el Carbono Total (CT) (r : 0.36; 0.37) y el Carbono Orgánico Total (COT) (r : 0.38; 0.29), y a su vez del CbioS con el Stock del C orgánico (COSstock) (r : 0.29). Por otro lado, no se evidenció correlación de CbioS con CbioW y CbioI, ni entre estos últimos. Se evidenció una correlación mayor en el uso de pasto y pasturas con el CbioS, donde éste constituyó aproximadamente el 0.69% del CT y el 0.73% del COT, en pasturas; y el 2.29% del CT y el 2.38% del COT, en pasto.

PALABRAS CLAVE

Carbono de biomasa microbiana; carbono orgánico total; uso actual de tierra.

INTRODUCCIÓN

El carbono del suelo se puede utilizar como un indicador de cambios por un número de razones: está vinculado a los estados del ecosistema y tiene "memoria", es decir, cambia a través del tiempo; sin embargo, puede que no sea fiable como un indicador solitario de la calidad/salud del suelo, ya que no puede abarcar todas las características de los ecosistemas (Janzen, 2005). Si bien el suelo contiene C en diversas formas y tiempos de residencia, una atención considerable en investigación se ha centrado en el carbono orgánico del suelo (COS), ya que se ha modificado en



gran medida a través de las actividades humanas, y se prevé que disminuya con el aumento de las temperaturas medias globales, lo que tendría efectos adversos sobre las funciones y los procesos del suelo importantes y la calidad/salud del suelo (Lal *et al.*, 2007).

La biomasa microbiana es una pequeña fracción de la materia orgánica, pero por su alto recambio supone una rápida fuente de nutrientes de gran importancia para la nutrición vegetal, además de estar implicada, entre otros, en procesos de formación y estabilización de los agregados (Guerrero *et al.*, 2003). El carbono de la biomasa microbiana (C_{bio}) es un indicador biológico muy empleado en la evaluación de calidad del suelo. Las variaciones en la biomasa microbiana constituyen un índice temprano de los cambios en el contenido de materia orgánica (MO) y de los efectos de las tensiones en el ecosistema del suelo. La biomasa microbiana, representa de 1 a 5% del total de la materia orgánica del suelo (FAO, 2002). De forma similar al C lábil, ha mostrado ser sensible a los cambios ambientales a corto plazo (Haynes, 2008), con estudios recientes revelan disminución significativa en la biomasa microbiana del suelo durante experimentos de calentamiento climático a largo plazo (Rinnan *et al.*, 2007).

Los principales criterios detrás de la adopción de un método analítico específico por un laboratorio son la conveniencia, efectividad de costo y el nivel de exactitud (Perie & Ouimet, 2008). La propuesta involucra adoptar la utilización del TOC-L Shimadzu, un analizador de carbono, para una determinación rápida, segura y ambientalmente amigable de la C_{bio}, comparando métodos de determinación del C_{bio} tradicionales, como Walkley-Black (C_{bio}W), Fumigación e Incubación (C_{bio}I), y a su vez otros parámetros también considerados indicadores de calidad de un suelo. Para esto, se trabajará con suelos contrastantes en cuanto a propiedades físico-químicas y de uso actual de la tierra.

MATERIALES Y MÉTODOS

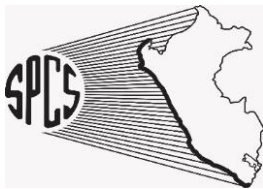
1. Área de estudio

El estudio fue realizado en los Andes Centrales del Perú, sobre los 4000 m.s.n.m. Específicamente en las Provincias de Junín y Yauri en el Departamento de Junín. Los suelos en estudio son predominantemente Inceptisoles del Suborden Ustepts, y Entisoles de los subórdenes Orthents y Fluvents (Gobierno Regional de Junín, 2015).

2. Obtención del carbono de la biomasa microbiana del suelo (C_{bio})

Fumigación e incubación (Jenkinson & Powlson, 1976)

Se secó la muestra al aire evitando su contaminación. Luego, se tamizó el suelo con una malla de 2 mm de diámetro. El suelo seco se expuso a los vapores de cloroformo puro. Se llevó a una humedad del 25% y se inoculó con el equivalente al 2% del peso total. Luego, se incubaron en frascos herméticamente cerrados para la evaluación del CO₂ a través de la absorción con álcali durante 10 días. Pasado el tiempo de



incubación, se procedió a titular con ácido (HCl 0.5 N), a fin de cuantificar de la cantidad de CO₂ producido. Finalmente, el Carbono de la Biomasa Microbiana (Cbiol) se expresó como: $C_{biol} = \text{mg de CO}_2 / \text{g de suelo seco} = X - Y / k$

Donde: X = mg de CO₂ / g de suelo fumigado, inoculado e incubado durante 10 días, Y = mg de CO₂ / g de suelo no fumigado e incubado durante 10 días, k = constante, se usa en general el valor 0.45 que representa la fracción de la biomasa total del suelo que puede ser mineralizada en estas condiciones (Wu *et al.*, 1990).

Fumigación y extracción (Brookes *et al.*, 1985)

Se ubicaron placas de 10 cm de diámetro conteniendo 10 g de suelo, previamente tamizados con una malla de 2 mm, y se realizó la fumigación. Para realizar la extracción del carbono proveniente de la biomasa microbiana del suelo, los 10 g de suelo pasaron a un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad y se añadieron 40 ml de una solución de sulfato de potasio 0.5 M, los cuales fueron sometidos a agitación horizontal por espacio de 1 hora. Luego, se obtuvo el extracto de suelo empleando papel filtro Whatman N°42. Las muestras controles siguieron el mismo procedimiento con excepción de que no fueron sometidas a fumigación.

El C orgánico extraído en una solución de K₂SO₄ (0.5 M) es determinado en muestras de suelo fumigadas y no fumigadas, el incremento en las cantidades de C en las muestras fumigadas con respecto a los controles es considerado como carbono de la biomasa microbiana del suelo.

Determinación empleando el analizador de carbono TOC-L Shimadzu

El carbono en el extracto de suelo fue determinado por el método catalítico de la oxidación por combustión a 680 °C. El C en la biomasa microbiana del suelo se calculó de la siguiente manera:

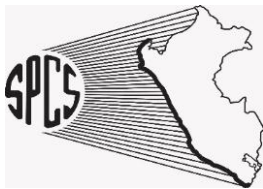
$C \text{ en la biomasa} = E_c / K_{ec}$

Donde: E_c es la diferencia entre el C determinado en las muestras fumigadas con respecto al C determinado en las muestras no fumigadas. K_{ec} considerado fue 0.4 (Högberg, 2002).

Titulación con sulfato de amonio ferroso acidificado (Nelson & Sommers, 1982).

Se transfirieron 4 ml del extracto de muestra en un tubo de digestión se adicionó 1 ml de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 0.0667 M y 5 ml de H₂SO₄ concentrado, mezclando todo el tiempo. Se prepararon blancos (con agentes pero sin extractos). Se situaron los tubos en un bloque precalentado a 150 °C por 30 minutos. Se dejaron blancos sin calentar. Se transfirieron cuantitativamente los contenidos de los tubos a matraces, y se adicionaron 0.3 ml (3-4 gotas) de solución indicadora de fenantrolina. Se titularon con solución de Sulfato de amonio ferroso acidificado (0.033 M), y anotó el gasto para cada muestra (ml muestra), el blanco calentado (ml HB) y el blanco no calentado (ml UB). El C_{bio} del suelo se calculó de la siguiente manera:

$\text{Carbono orgánico (\%)} = ((A \times M \times 0.003)/g) \times (E/S) \times 100$



Donde: T = Titulado de estandarización, M = Molaridad del Sulfato de amonio ferroso (0.033 M), A = (ml HB- ml muestra) x ((ml UB-ml HB)/ml UB) + (ml HB-ml muestra), g = masa del suelo seco (g), E = Volumen de extracción (ml), S = Volumen de digestión de muestra (ml).

1. Carbono total (CT) y carbono orgánico total del suelo (COT)

El carbono total del suelo fue medido insertando 30mg de muestras molidas en bola y secadas en horno, en un analizador elemental de combustión seca (Vario Micro cube, Elementar, Hanau, Germany). Por otro lado, para medir el COT, los carbonatos fueron removidos del suelo por fumigación ácida con HCl, siguiendo una modificación de Ramnarine *et al.* (2011). Seguidamente, los suelos fueron secados a estufa a 60°C por 48 horas y la concentración de C fue medida en un analizador elemental de combustión seca (Vario Micro cube, Elementar, Hanau, Germany).

2. Stock del carbono orgánico del suelo (COS stock)

Se estimó el stock de C orgánico del suelo en el perfil de suelo arable (0-30 cm). La densidad aparente de la matriz del suelo se midió utilizando un cilindro metálico de 5 cm de diámetro (profundidad del suelo: 15 a 20 cm) y después de la corrección de los fragmentos gruesos sugeridos por Hao *et al.* (2008).

3. Análisis estadístico

Los análisis fueron realizados empleando los paquetes *xlxs*, *Agricolae*, y *FactomineR*, del ambiente para cómputo estadístico R versión 3.3.2 (R Core Team, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) entre todos los parámetros evaluados (Data no mostrada), a partir del cual se visualizó la distribución de los resultados de Cbio de cada uno de los métodos evaluados. Observándose una mayor correspondencia entre el CbioS y el Cbiol con los parámetros principales en conjunto (CT, COT, COS stock, entre otros). Se obtuvo una correlación positiva del CbioS y Cbiol, con el CT (r: 0.36; 0.37) y el COT (r: 0.38; 0.29), y a su vez del CbioS con el COS stock (r: 0.29).

En el análisis de distribución de muestras por uso actual de tierra, las de pasturas y pastos mostraron un comportamiento similar para los parámetros evaluados. Evidenciándose una correlación mayor de estos con el CbioS, donde éste constituyó aproximadamente el 0.69% del CT y el 0.73% del COT, en pasturas; y el 2.29% del CT y el 2.38% del COT, en pasto (Fig.1, Fig.2).

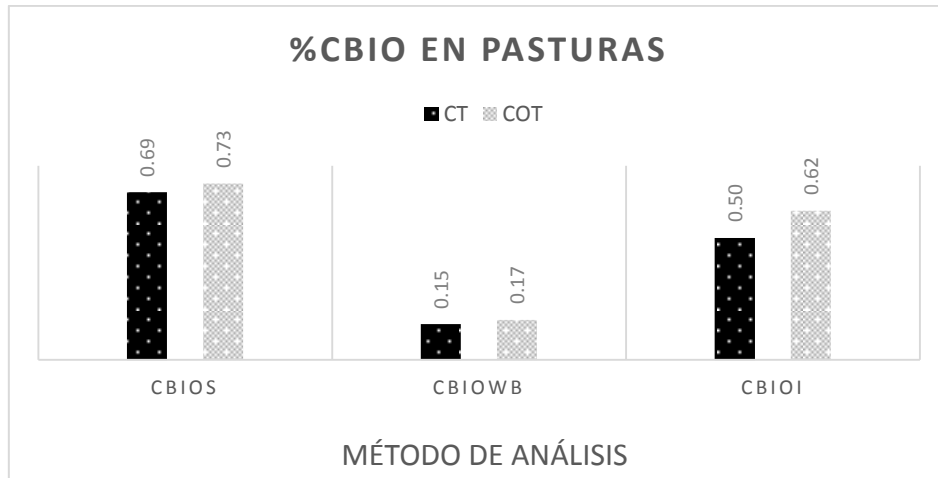


Fig. 1. Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pasturas.

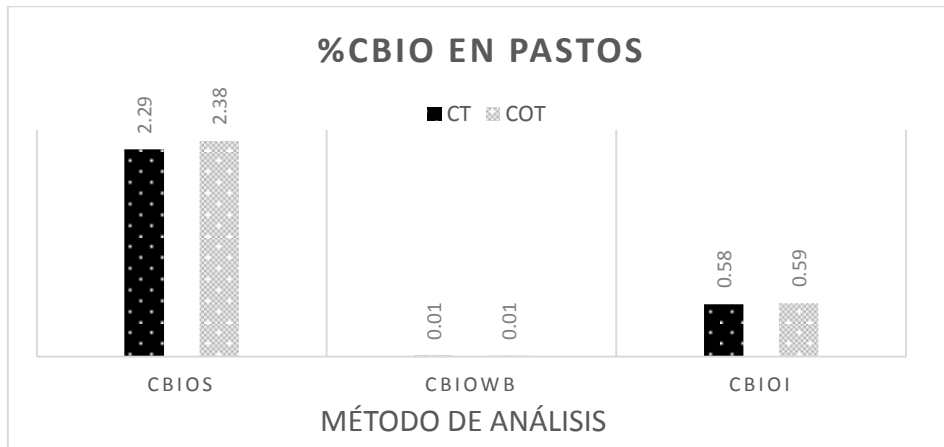


Fig. 2. Porcentaje del Cbio respecto al CT y COT según cada método de análisis en el uso de pastos.

A partir de los resultados, se observa una gran subestimación del Cbio presente cuando se utiliza el método tradicional de Walkley –Black.

Por otra parte, el método por el cual se obtuvo CbioS, da resultados mayores al de CbioI; sin embargo, se encuentra dentro del rango indicado por Haider *et al.*, 1991, de alrededor del 2% en el análisis de pastos.

Los valores obtenidos de CbioS son variables dentro de cada uso actual de tierra; sin embargo, la mediana mostró cierta tendencia en mayores valores en campos de cultivo de maca, seguido de pastos, pasturas y descanso (barbecho). Si bien la literatura (Sparling *et al.*, 1992; Haider *et al.*, 1991) da cuenta de mayores valores en pastos y pasturas con respecto a terrenos cultivados, es de destacar que el cultivo de maca no utiliza mayores labores agrícolas que puedan mermar dicho valor, y se cree por el contrario que los exudados radiculares incrementan la población microbiana.



CONCLUSIONES

- Hubo correlación positiva del CbioS y Cbiol, con el Carbono Total (CT) (r: 0.36; 0.37) y el Carbono Orgánico Total (COT) (r: 0.38; 0.29), y a su vez del CbioS con el Stock del C orgánico (COS stock) (r: 0.29).
- Las muestras de pasturas y pastos mostraron una distribución similar para los parámetros evaluados.
- El CBioS constituyó aproximadamente el 0.69% del CT y el 0.73% del COT, en pasturas; y el 2.29% del CT y el 2.38% del COT, en pasto.
- Se observa subestimación del Cbio presente cuando se utiliza el método tradicional de Walkley –Black.
- No se evidenció correlación de CbioS con CbioW y Cbiol, ni entre estos últimos, lo cual da cuenta de la poca sensibilidad de determinación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por el apoyo en el análisis químico de los suelos, y al *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) por financiar parcialmente el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brookes, PC., Landman, A., Pruden, G. & Jenkinson, DS. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 17: 837-842.
- FAO. 2002. Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra. Informes sobre recursos mundiales de suelos. Basado en el trabajo de Michel Robert. Institut National de Recherche Agronomique. París, Francia.
- Gobierno Regional de Junín. 2015. Zonificación Ecológica Económica. Junín: Gobierno Regional de Junín.
- Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Rodríguez, F., García-Orenes, F., Gómez, I. & Moral, R. 2003. Carbono microbiano edáfico en suelos afectados por fuego y enmendados con diferentes residuos orgánicos. *Edafología* 10(2): 185-190.
- Haider J., Marumoto, T. & Kalam Azad, A. 1991. Estimation of Microbial Carbon and Nitrogen in Bangladesh Soils. *Soil Science & Plant Nutrition* 37(4): 591-599.
- Hao, X., Ball, BC., Culley, JLB., Carter, MR., Parkin, GW. 2008. Soil density and porosity. En: Gregorich, EG., Carter, MR. (Eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. Second edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 744-747.
- Haynes, RJ. 2008. Soil organic matter quality and the size and activity of the microbial biomass: their significance to the quality of agricultural soils. En: Huang, Q., Huang, PM. &



XVI Congreso Nacional y VII Internacional de la Ciencia del Suelo

“Crianza del suelo para el buen vivir”

Ayacucho, Perú – 22 al 25 de mayo de 2017

- Violante, A. (eds) Soil mineral-microbe-organic interactions: theories and applications. Springer, Berlin, pp. 201–230.
- Högberg, MN. & Högberg P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791–795.
- Janzen, HH. 2005. Soil carbon: A measure of ecosystem response in a changing world?. *Canadian Journal of Soil Science* 85:467–480.
- Jenkinson, DS. & Powlson, DS. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil I. *Soil Biology & Biochemistry* 8: 167-177.
- Lal, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304:1623-1628.
- Nelson, DW. & Sommers, LE. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter: *En*: Page, AL., Miller, RH. and Keeney, DR. Methods of soil analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties, pp: 539-579.
- Périé, C. & Ouimet, R. 2008 Organic carbon, organic matter and bulk density relationships in boreal forest soils. *Canadian Journal of Soil Science* 88: 315-325.
- R Core Team. 2016. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, R foundation for statistical computing. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramnarine, R., Voroney, R.P., Wagner-Riddle, C. & Dunfield, K.E. 2011. Carbonate removal by acid fumigation for measuring the $\delta^{13}\text{C}$ of soil organic carbon. *Canadian Journal of Soil Science* 91: 247-250.
- Rinnan, R., Michelsen, A., Baath, E. & Jonasson, S. 2007. Fifteen years of climate change manipulations alter soil microbial communities in a subarctic heath ecosystem. *Global Change Biology* 13(1): 28-39.
- Sparling, GP. 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* 30: 195-207.
- Wu, J., Joergensen, RG., Pommerening, B., Chaussod, R. & Brookes, PC. 1990. Measurement of soil microbial biomass C by fumigation-extraction-an automated procedure. *Soil Biology & Biochemistry* 22:1167-1169.