

Consumo de Carbono, Productividad Microbiana y Actividad Biológica en Suelos Suplementados con Glucosa: Efecto de la Cantidad de Sustrato Incorporada, Tipo de Suelo, Temperatura y Humedad¹

R. Alvarez*, O.J. Santanotoglia*

ABSTRACTS

Different soils were altered with glucose to study the effects of the addition of assimilable carbon on soil biological activity and biomass. The rate of carbon utilization increased with the quantity of substrate added and when soluble glucose was exhausted, about 45% of the incorporated carbon still remained in the soil. The growth yield varied from 44 to 14% and carbon consumption for maintenance rose from 1.5 to 17 mg C.g⁻¹ C-biomass.h⁻¹ as glucose concentration increased. Formed biomass died with time; apparently the remaining carbon was utilized. This process was more intense where higher doses of glucose were added. Soil organic matter, temperature and water content affected substrate metabolism during the initial days of incubation but their effects disappeared after four months.

INTRODUCCION

La utilización microbiana de sustratos carbonados en el suelo está afectada por la cantidad de carbono disponible para los microorganismos. Así, la eficiencia aparente de conversión de sustrato en biomasa disminuye en suelos suplementados con glucosa al aumentar la cantidad incorporada (17); se ha observado una menor residualidad de grandes aportes de la misma, respecto a pequeños agregados. Luego de varios meses de incubación (1) También, las propiedades del suelo influyen sobre ella. La fertilidad nitrogenada tiene un efecto de aceleración sobre la velocidad de utilización del carbono asimilable (5), en tanto que las partículas finas ejercen una acción protectora sobre este elemento, disminuyendo su ritmo de consumo (18, 21).

Como factores de control de la actividad biológica, la temperatura y la humedad juegan un papel importante en la regulación del consumo del material ener-

COMPENDIO

Para determinar el efecto del agregado de carbono fácilmente asimilable sobre la microflora edáfica, se suplementaron varios suelos con glucosa y se siguió la actividad biológica y la biomasa microbiana durante cuatro meses. El ritmo de consumo aumentó con la cantidad de sustrato incorporada, quedando en el suelo como remanente, al agotarse la glucosa soluble, aproximadamente un 45% del carbono agregado. El rendimiento en biomasa microbiana decreció del 44 al 14% al subir la dosis de glucosa, el requerimiento de mantenimiento pasó de 1.5 a 17 mg C.g⁻¹ C-biomasa.h⁻¹. Con el transcurso de los meses se produjo la muerte gradual de la biomasa formada y consumo del carbono remanente, siendo este proceso más intenso donde se agregó más material energético. El nivel de materia orgánica del suelo, la temperatura y la humedad influyeron sobre el proceso de utilización del carbono durante los primeros días de incubación pero, a los cuatro meses, desaparecieron sus efectos.

gético (9, 14, 20), existiendo un nivel óptimo para cada una, en el cual el sustrato se utiliza más rápidamente, dependiendo de la interacción entre ambas variables (4)

El objeto de este trabajo es determinar cómo influye la cantidad de glucosa que se agrega al suelo sobre el ritmo de consumo, el rendimiento del desarrollo y el mantenimiento celular de la flora microbiana y qué efecto tienen algunas propiedades edáficas, la temperatura y la humedad sobre la actividad biológica de los suelos suplementados y sobre la residualidad del aporte carbonado.

MATERIALES Y METODOS

Los suelos utilizados, cuyo origen y principales propiedades se indican en el Cuadro 1, fueron tomados del horizonte superficial, secados al aire, molidos y tamizados por malla de 2 mm. Diez días antes de comenzar las incubaciones se les humedeció a capacidad de campo y se les mantuvo a temperatura ambiente hasta el inicio de las experiencias. Porciones equivalentes a 50 g de suelo seco se pesaron en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad y se les agregó glucosa en solución en dosis de 0 a 4 000 µg C g⁻¹ suelo. En algunos casos, las soluciones de glucosa se marcaron con D-(1-¹⁴C)-glucosa de una actividad especi-

¹ Recibido para publicación el 15 de diciembre 1988. Agradecemos al Dr. Noe Altshuler de la Comisión Nacional de Energía Atómica por la donación de la glucosa marcada utilizada.

* Centro de Radiobiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Avenida San Martín 4453 (1417), Buenos Aires, República Argentina.

fica de $6.66 \text{ GBq} \cdot \text{mMol}^{-1}$ para lograr una actividad final de $1.33 \text{ MBq} \cdot \text{g}^{-1}$ suelo. La humedad de los suelos se llevó al 50% de la CRH y la temperatura de incubación fue de 30°C a menos que se indique otra cosa.

La presencia de glucosa libre en la solución del suelo se determinó por el método del fenol (7) sobre extractos obtenidos por agitación de 3 g de suelo húmedo con $(\text{OH})_2\text{Ca}$ al 0.2% en relación 1:5, agitados durante 10 minutos y clarificados por centrifugación. Esta técnica permitió obtener una recuperación cuantitativa en ensayos previos de adición de glucosa al suelo. La respiración microbiana se midió por el método de absorción en álcali empleando OHK y titulando el exceso del hidroxido con HCl, usando fenofaleína como indicador. Para determinar la cantidad de carbono generado a partir del sustrato marcado, se realizó la absorción del $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ en OHK 1 N. En el momento de la medición se diluyó el álcali en una relación 1:4 y se contó 0.5 ml de esta solución en cazoletas metálicas con un tubo Geiger-Müller de ventana de $2\text{-}3 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ con una eficiencia de conteo del 4%. Con este sistema se produjo una pérdida de actividad por autoabsorción del 7% por lo que las mediciones se corrigieron por este factor. El contenido de carbono en la biomasa microbiana se analizó por la técnica de la fumigación con cloroformo (9). En algunos casos, este método no pudo ser aplicado sobre muestras recientemente suplementadas con glucosa por razones que se indican más adelante, debido a lo cual el carbono microbiano se estimó con base en la producción de C-CO_2 del suelo fumigado sobre un factor de mineralización de 0.7 (2).

Se establecieron cinco repeticiones para cada tratamiento y el análisis de los datos se efectuó por ANVA y el test de Duncan. La comparación de las pendientes de los modelos de regresión se hizo mediante la prueba de t.

RESULTADOS Y DISCUSION

Utilización del sustrato y desarrollo celular

El ritmo de consumo de glucosa, en el suelo 4 de textura franco-limosa, varió de 100 a $500 \mu\text{g C} \cdot \text{g}^{-1}$ suelo $\cdot \text{d}^{-1}$ al incrementarse la cantidad suplementada de 200 a $4000 \mu\text{g C-glucosa} \cdot \text{g}^{-1}$ suelo, lo que determinó que el tiempo necesario para que desapareciera la misma de la solución edáfica, aumentarse a tasa decreciente (Fig. 1a). También se ha observado mayores velocidades de utilización en suelos arenosos (6), al incrementarse la dosis aplicada de glucosa. Este fenómeno podría ser el resultado de dos procesos distintos; por un lado, la mayor concentración del sustrato generada con mayores aportes, favorecería una más rápida difusión y absorción de las moléculas de glucosa por las células microbianas y por el otro, la mayor

cantidad de biomasa formada consumiría el carbono remanente más rápido.

La utilización de la técnica de Jenkinson y Powlson (9) para determinar la biomasa microbiana en los suelos suplementados dio valores anómalos e inclusive negativos, pocos días luego del agregado de la glucosa, donde se incorporó grandes cantidades de sustrato (Cuadro 2). Esto se debe a que el método ha sido ideado para aplicarse en suelos que no han recibido recientemente aportes energéticos y donde, en conse-

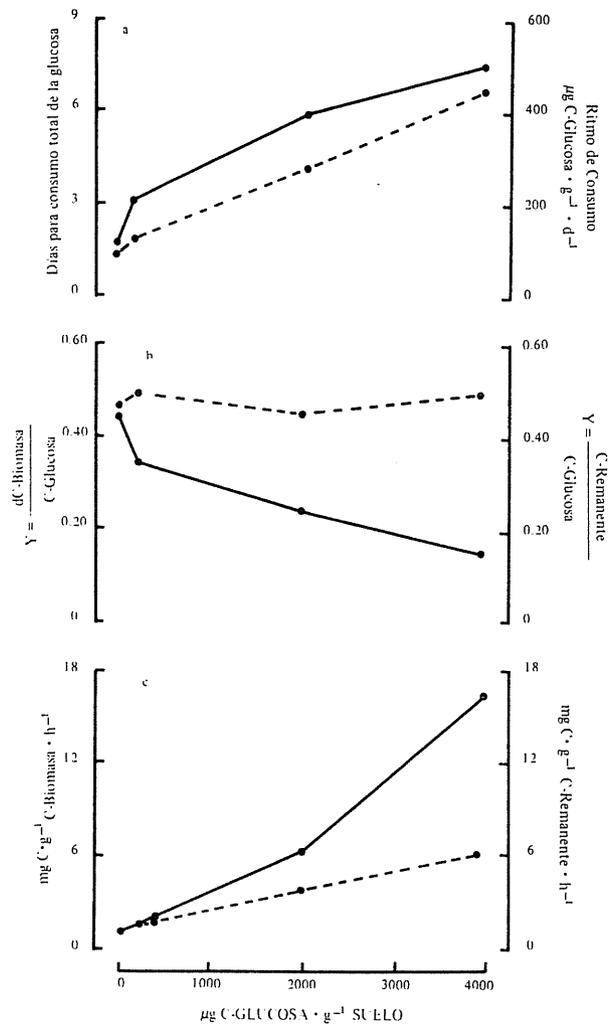


Fig. 1. Relación entre (a) dosis de glucosa incorporada al suelo y el consumo de carbono (a), el rendimiento del desarrollo (b) y el mantenimiento celular (c). Las líneas de puntos corresponden al eje izquierdo.

$Y = \frac{\text{Rendimiento aparente del desarrollo, C-Glucosa}}{\text{Carbono incorporado dc-Biomasa}} = \frac{\text{Aumento del C-Biomasa del tratamiento suplementado respecto al testigo.}}{\text{C-Remanente}} = \frac{\text{Cantidad del carbono agregado remanente calculada asumiendo que la diferencia entre el C-CO}_2 \text{ producido por el suelo suplementado y el testigo proviene del sustrato.}}{\text{C-Remanente}}$

Cuadro 1. Principales propiedades de los suelos.

Suelo	Origen	Clasificación	Textura	% arc.	% limo	% are.	% Corg.	pH
1	La Carlota (Córdoba)	Hapludol entico	Franco-arenosa	5.2	38.7	56.1	1.25	6.3
2	Los Toldos (Buenos Aires)	Hapludol típico	Franco-limoso	10.2	50.9	38.9	2.69	6.0
3	Rojas (Buenos Aires)	Argiudol típico	Franco-limosa	15.9	69.0	15.1	3.04	6.3
4	Fac. Agron. (Buenos Aires)	Argiudol típico	Franco-limosa	15.2	75.0	9.8	1.56	5.8

cuencia, la respiración del suelo testigo es baja. Aquí, durante los primeros días de incubación, la actividad biológica del suelo no fumigado, (aún luego del consumo total de la glucosa) llegó a ser 11 veces superior a la de las muestras que no fueron suplementadas. Por ello, el carbono microbiano se estimó en forma aproximada utilizando solamente la producción de C-CO₂ del suelo fumigado.

Luego de que la glucosa soluble desapareció del suelo, la cantidad de carbono agregado remanente, determinada por el método diferencial, osciló entre el 40 y el 49%, manteniéndose independiente del volumen de sustrato agregado; sin embargo, el rendimiento en biomasa decreció al aumentar la dosis de glucosa (Fig. 1b). Debido a ello, con el suplemento de 200 µg C-glucosa.g⁻¹ suelo, casi todo el carbono no respirado formaba parte de cuerpos microbianos vivos, en tanto que, al aumentar la cantidad de sustrato, menor era la fracción que constituía a éstos y más carbono se encontraba como productos del metabolismo. El agotamiento de algún elemento esencial para el crecimiento de la flora parecería ser la causa de este fenómeno, determinando que los microorganismos que no estaban limitados en carbono, pero sí en otro factor de desarrollo, derivasen el exceso de sustrato asimilable hacia la síntesis de polisacáridos (2).

Para estimar el requerimiento energético de mantenimiento de la biomasa microbiana se midió la producción de C-CO₂ de los suelos suplementados durante las 24 horas siguientes al momento en que se consumió totalmente la glucosa; en base a la masa celular presente en ese momento se calculó el coeficiente de mantenimiento. Este procedimiento se sustenta en el supuesto de que, cuando el sustrato asimilable se termina, la biomasa deja de crecer y todo el carbono que utiliza lo deriva para cumplir las funciones de sostén del metabolismo, no incorporando por lo tanto al elemento y liberándolo como C-CO₂. Este supuesto, aparentemente, se cumplió a los fines del cálculo ya que la biomasa disminuyó durante el período considerado entre el 1 y el 3% según el tratamiento. En el caso del suelo testigo, donde la misma no varió en la primera semana de incubación, se determinó el man-

tenimiento como la producción diaria media de C-CO₂ sobre la biomasa presente. El consumo de carbono por unidad de carbono así calculado, aumentó con la dosis de glucosa aplicada, llegando a ser hasta 11 veces mayor al del testigo (Fig. 1c). Dicho consumo siguió la misma tendencia cuando se calculó computando el carbono en la biomasa más el carbono agregado remanente. La multiplicación de organismos adaptados a crecer en medios con alta concentración de carbono disponible y con un intenso metabolismo celular podría explicar este hecho. En el suelo, el sustrato energético suele ser un factor limitante para el desarrollo por lo que es de esperar que su flora original esté compuesta por formas de bajo requerimiento carbonado. De esta manera, cuanto más glucosa se agrega se produce más nueva biomasa, disminuyendo la proporción de la población microbiana representada por los organismos presentes al inicio de la incubación y aumentando en consecuencia el mantenimiento celular.

Con el transcurso del tiempo disminuyó la biomasa microbiana en todos los tratamientos y especialmente en el caso de los suelos suplementados, tendiendo a igualarse al testigo. Este proceso de muerte de la biomasa formada tras el agregado de materiales energéticos, cuando éstos se agotan, es normal en el suelo (3, 11, 13, 15, 19). El carbono remanente también dismi-

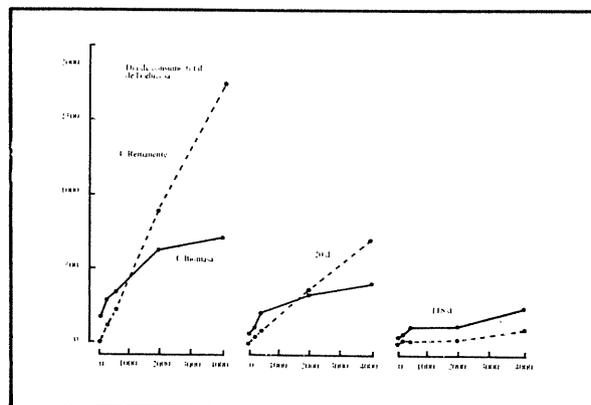


Fig. 2. Variación del Carbono Remanente y de la biomasa microbiana en función de la dosis de glucosa y del tiempo de incubación.

nuyó con el tiempo y se redujo proporcionalmente más con las mayores dosis de glucosa (Fig. 2). Si bien el método diferencial no permite identificar el origen del carbono respirado, el balance que se realiza mediante su aplicación indica que las muestras que recibieron más glucosa respiraron una cantidad de carbono equivalente a una mayor fracción de ella.

Efecto de factores ambientales

El ritmo inicial de producción de C-CO₂ estuvo marcadamente influenciado por el tipo de suelo, la temperatura y la humedad (Fig. 3). De los factores edáficos, el contenido de materia orgánica parecería ser la propiedad más importante en determinar la velocidad de utilización del sustrato ya que en el suelo 3, con alto tenor de este elemento, la actividad biológica fue significativamente mayor durante los dos primeros días de incubación (P = 0.05) y la glucosa se consumió más rápido. La mayor temperatura también produjo una respiración más intensa durante el primer día (sig. P = 0.01) y un más alto ritmo de utilización del carbono agregado. Niveles crecientes de humedad determinaron que se redujera el período de retraso previo a la aparición de un pico de generación de C-CO₂ y que este fuera más importante, desapareciendo la glucosa de la solución del suelo antes con mayores tenores hídricos.

La producción acumulada de C-CO₂ de los suelos no suplementados se ajustó al modelo lineal (Fig. 4)

Cuadro 2. Determinación del carbono en la biomasa microbiana usando como control la producción de C-CO₂ del suelo no fumigado y sin usar control.

Tratamiento μg C-glucosa.g ⁻¹ s.	μg C-biomasa.g ⁻¹ suelo					
	F _{O-10} -NF ₁₀₋₂₀ 0.45			F _{O-10} 0.7		
	CG	20 d	118 d	CG	20 d	118 d
0	209	161	109	186	157	110
200	309	208	122	274	191	127
400	347	263	198	311	243	179
2 000	720	432	157	683	384	157
4 000	220	-176	224	751	463	387

CG representa el día en que desapareció la glucosa de la solución del suelo en cada tratamiento.

F₀₋₁₀ = producción de C-CO₂ del suelo fumigado con cloroformo en el período 0-10 días de incubación.

NF₁₀₋₂₀ = producción de C-CO₂ del suelo no fumigado en el período 10-20 días de incubación.

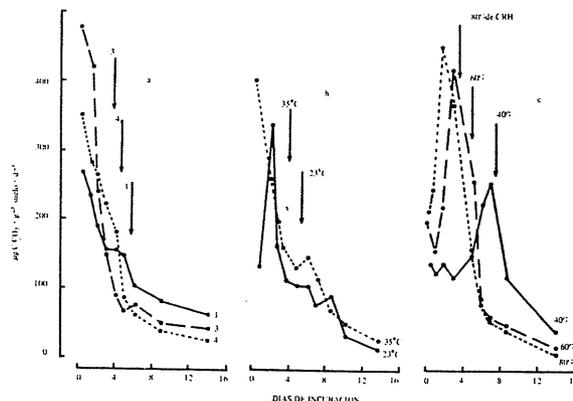


Fig. 3. Ritmo respiratorio de suelos suplementados con 2000 μg C-glucosa · g⁻¹ suelo. Las flechas indican el día en que ya no se detectó glucosa soluble. a. Los números indican el suelo utilizado, b. Se usó el suelo 2, c. Se usó el suelo y

siendo en todos los casos el coeficiente de correlación ≥ 0.99 (sig. P = 0.001). La pendiente de la recta de regresión del suelo 3 fue significativamente mayor (P = 0.001) que las de los suelos 1 y 4. El aumento de la temperatura de 23°C a 35°C produjo un incremento del 200% en la tasa de mineralización de la materia orgánica del suelo (sig. P = 0.001) y al subir el tenor de agua también aumentan significativamente las pendientes de las regresiones (P = 0.001).

La materia orgánica regula en gran medida la actividad biológica al actuar como fuente de energía y nutrientes para los microorganismos (16). Esto explica la mayor respiración producida en el suelo más rico en carbono. Con respecto a la temperatura, se cumplió la regla de van t'Hoff, según la cual la velocidad de un proceso biológico a (t + 10°C) es 2-3 veces mayor que a t. La actividad microbiana en relación al contenido de humedad del suelo suele ser máxima entre el 40 y 100% de la CRH siguiendo en general una

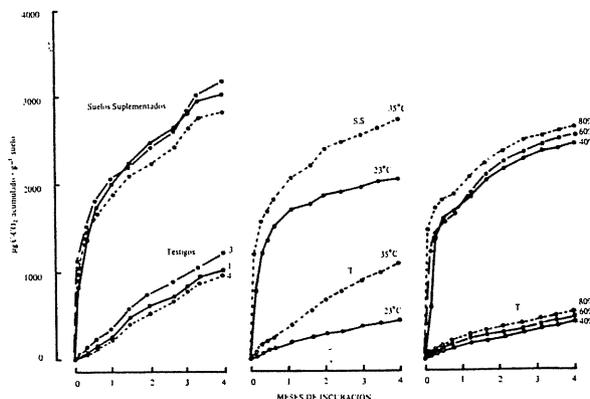


Fig. 4. Producción acumulada de C-CO₂ de suelos suplementados con 2000 μg C-glucosa · g⁻¹ suelo a) comparación de suelos 1, 2 y 3, b) efecto de la temperatura y c) efecto del nivel de humedad (% CRH).

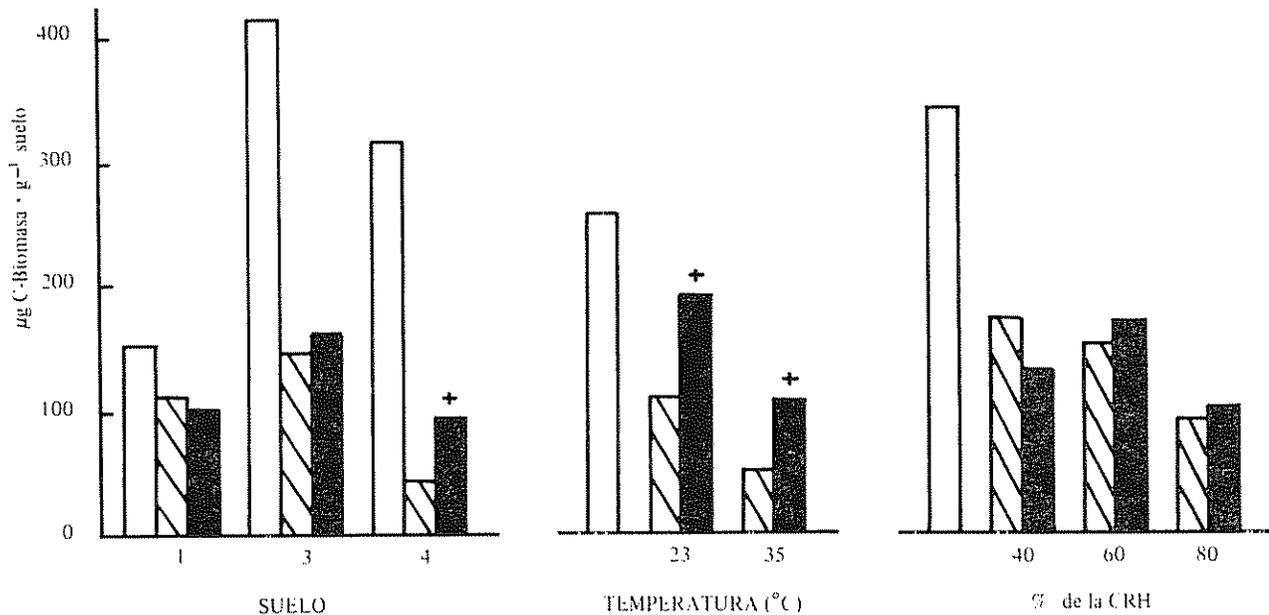


Fig. 5 Biomasa microbiana inicial y final de los suelos testigos y suplementados. Biomasa inicial, biomasa final suelo testigo, biomasa final suelo suplementado. Las + indican diferencias significativas ($P = 0.01$) entre la biomasa final de los suelos suplementados y los testigos. El efecto de la temperatura se probó en el suelo 2 y el de la humedad en el suelo 4.

tendencia parabólica (8). Aquí, la respiración aumentó de manera casi lineal entre el 40 y 80% de la CRH no llegando a observarse disminución de la producción de $C-CO_2$ por exceso de humedad.

Luego de las primeras semanas de muy intensa actividad biológica, en los suelos suplementados el ritmo de producción de $C-CO_2$ tendió lentamente a igualarse al de los testigos. La cantidad del carbono agregado, remanente, determinada por el método diferencial, osciló entre el 39 y el 56% en el momento de consumo total de la glucosa. A los siete días de incubación, la diferencia entre la cantidad de $C-CO_2$ respirada por las muestras a las que se agregó carbono y los testigos fue significativamente mayor para los suelos 3 y 4 respecto al 1 ($P = 0.01$), para $35^\circ C$ respecto a $23^\circ C$ ($P = 0.01$) y para 80% de la CRH respecto a 60% y de este respecto a 40% ($P = 0.05$). Estas diferencias desaparecieron a los cuatro meses de incubación. Por otro lado, el contenido de carbono microbiano disminuyó en todos los casos, al fin de las experiencias, en relación al tenor inicial (sig. $P = 0.01$), no habiendo, excepto en algunos casos, diferencias significativas entre la biomasa de las muestras suplementadas y los testigos (Fig. 5). Estos resultados sugieren que las propiedades edáficas y condiciones de incubación afectan fundamentalmente la velocidad de utilización de la glucosa soluble y de los materiales celulares recientemente formados, tendiendo a estabilizarse la actividad biológica y la biomasa microbiana en niveles semejantes para los distintos tratamientos, luego de varios meses. Similares con-

clusiones se desprenden de los datos de Chahal y Wagner (5) sobre el efecto de la fertilidad y de Zunino *et al* (21) sobre la influencia de materiales alófanos en lo referente a residualidad de los aportes de glucosa al suelo.

Dinámica del primer carbono

La dinámica del primer carbono siguió en general una tendencia semejante a la del carbono total. Luego de una rápida caída inicial de la cantidad remanente, la velocidad de disminución de ésta fue decreciendo de manera gradual (Fig. 6). El proceso se ajustó a un modelo potencial negativo ($r \geq 0.99$; sig. $P = 0.05$), no habiendo diferencias entre las pendientes de las curvas correspondientes a distintos tipos de suelos y contenidos de humedad. En el caso de la temperatura, a $23^\circ C$ quedaba en el suelo, al consumirse totalmente la glucosa, 55% del $^{14}C_1$ incorporado y a $35^\circ C$ 64% (Dif. Sig. $P = 0.01$). A partir de ese momento, la tasa de pérdida de carbono fue semejante en ambos tratamientos. Esta diferencia, opuesta a la observada sobre el carbono total en base al método diferencial, parecería deberse a que el primer carbono siguió rutas metabólicas, distintas según la temperatura.

En resumen, el agregado de carbono fácilmente asimilable al suelo determina la proliferación de microorganismos con un alto ritmo de consumo energético, que, luego de utilizar el sustrato carbonado aprovechan el propio material celular. Crecientes aportes

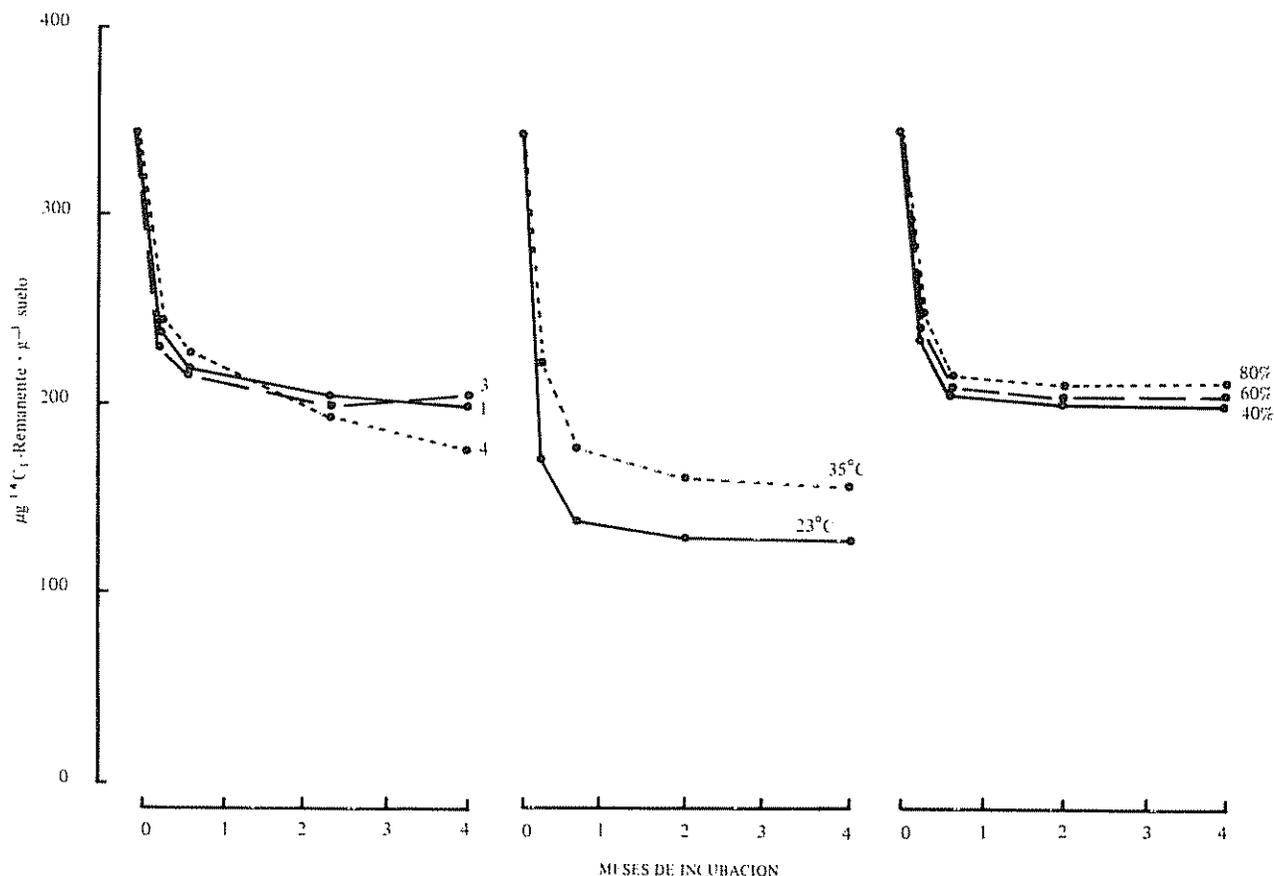


Fig 6 Variación del $^{14}\text{C}_1$ -Glucosa Remanente.

de glucosa generan mayor producción de esta biomasa metabólicamente más activa que la original del suelo y en consecuencia, una cantidad de carbono equivalente a una mayor fracción de la misma se des-

prende como C-CO_2 . El tipo de suelo, la temperatura y la humedad influyen sobre este proceso en las etapas iniciales pero luego de varios meses de incubación tienden a desaparecer sus efectos.

LITERATURA CITADA

1. ALVAREZ, R.; SANTANATOGLIA, O.J. 1986. Respuesta respiratoria del suelo al agregado de distintas cantidades de carbono asimilable. In Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (11., 1986, Neuquén)
2. ALVAREZ, R.; SANTANATOGLIA, O.J. 1987. Determinación de la biomasa microbiana del suelo por el método de la fumigación con cloroformo usando tres procedimientos diferentes. A consideración Rev. Fac. Agron. (UBA).
3. AMATO, M.; LADD, J.N. 1980. Studies of nitrogen immobilization and mineralization in calcareous soils. V. Formation and distribution of isotope-labelled biomass during decomposition of ^{14}C - and ^{15}N -labelled plant material. *Soil Biology and Biochemistry* 12:405-411
4. BODDY, L. 1983. Carbon dioxide release from decomposing wood: effect of water content and temperature. *Soil Biology and Biochemistry* 15:501-510.
5. CHAHAL, K.S.; WAGNER, G.H. 1965. Decomposition of organic matter in sandborn field soils amended with C^{14} glucose. *Soil Science* 100:96-103.
6. CODDY, P.N.; SOMMERS, L.L.; NELSON, D.W. 1986. Kinetics of glucose uptake by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 18:283-289.
7. HERBERI, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGE, R.E. 1971. Carbohydrate analysis and methods in microbiology. v. 5B, p. 265-278.
8. INO, Y.; MONSI, M. 1969. An experimental approach to the calculation of CO_2 amount evolved from several soils. *Jap. Journ. Bot.* 20:153-188.

9. JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.A. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. -V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8:209-213.
10. JENKINSON, D.S.; AYANABA, A. 1977. Decomposition of carbon-14 labelled plant material under tropical conditions. *Soil Science Society of America Journal* 41:912-915.
11. KELLEY, K.R.; STEVENSON, F.J. 1985. Characterization and extractability of immobilized ^{15}N from the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 17:517-523.
12. KNAPP, E.B.; ELLIOTT, L.F.; CAMPBELL, G.S. 1983. Carbon, nitrogen and microbial biomass interrelationships during the decomposition of wheat straw: a mechanistic simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 15:455-461.
13. LADD, J.N.; OADES, J.M.; AMATO, M. 1981. Microbial biomass formed from ^{14}C , ^{15}N -labelled plant material decomposing in soils in the field. *Soil Biology and Biochemistry* 13:119-126.
14. MOORE, A.M. 1986. Temperature and moisture dependence of decomposition rates of hardwood and coniferous leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 427-436.
15. NANNIPIERI, P.; JOHNSON, R.L.; PAUL, E.A. 1978. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 223-229.
16. SCHNURER, J.; CLARHOLM, M.; ROSSWALL, I. 1985. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry* 17:611-618.
17. SPARLING, G.P.; ORD, B.G.; VAUGHMAN, D. 1981. Microbial biomass and activity in soil amended with glucose. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 99-104.
18. VAN VEEN, J.A.; LADD, J.N.; AMATO, M. 1985. Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with (^{14}C (U)) glucose and (^{15}N) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under different moisture regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 17:747-756.
19. VORONEY, R.P.; PAUL, E.A. 1984. Determination of k_c and k_n in situ for calibration of the chloroform fumigation-incubation method. *Soil Biology and Biochemistry* 16:9-14.
20. WILSON, J.M.; GRIFFIN, D.M. 1975. Water potential and the respiration of microorganisms in the soil. *Soil Biology and Biochemistry* 7:199-204.
21. ZUNINO, H.; BORIE, F.; AGUILERA, S.; MARTIN, J.P.; HAIDER, K. 1982. Decomposition of ^{14}C -labelled glucose, plant and microbial products and phenols in volcanic ash-derived soils of Chile. *Soil Biology and Biochemistry* 14:37-43.