

DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO PARA ESTIMAR LA FERTILIDAD BIOLÓGICA

Ruth Sivila de Cary¹
Hugo Guerrero Postigo²

INTRODUCCIÓN

La fertilidad del suelo es un tema que ha ocupado al hombre desde los inicios de la agricultura; hoy en día entendemos a la fertilidad como un sistema complejo en el que intervienen varios factores desde elementos físicos, químicos, biológicos, climáticos, socioeconómicos, culturales y políticos, que se expresan en las técnicas de producción e inciden finalmente en la fertilidad y productividad del suelo.

La importancia de los microorganismos del suelo y su relación con la fertilidad del suelo es conocido desde hace muchos años; mientras que su influencia en la calidad del suelo ha sido enfatizado recientemente (Visser & Parkinson 1992). La célula microbiana puede almacenar cantidades importantes de nutrientes. Estos nutrientes quedan inmovilizados en las células microbianas pero son de fácil liberación. Los mecanismos que controlan la proliferación y muerte de los microorganismos permiten que haya o no liberación de esos nutrientes a la solución del suelo (Anderson, 1978; Garcia & Morón 1992).

La biomasa microbiana del suelo constituye la parte viva de la materia orgánica y se ha sugerido que puede ser un indicador para estimar el pool de nutrientes disponible para las plantas sirviendo de reservorio de importantes nutrientes del suelo como nitrógeno, fósforo y azufre (Marumoto et al. 1982). Franzluebbers (1999) considera a la biomasa microbiana como la fracción activa de la materia orgánica del suelo y que modula la disponibilidad de nutrientes.

En los últimos años se han desarrollado variados métodos para determinar C ó N en la biomasa microbiana del suelo, incluyendo las variantes del método *cloroformo fumigación-incubación (CFI)*, (Jenkinson & Powlson 1976), *el método cloroformo fumigación-extracción (CFE)* (Brokes et al. 1985), *el método respiración inducida por substratos (SRI)* (Anderson & Domsch 1978) y *el método del trifosfato de adenosina (ATP)* (Webster et al. 1984). Numerosos artículos describen también las ventajas y desventajas de algunos de estos métodos (Smith & Paul 1990; Martens, R. 1995). El método de cloroformo fumigación- incubación ha sido el mas comúnmente utilizado para determinar la biomasa microbiana expresada en C. Actualmente el método de cloroformo fumigación-extracción está dominando las investigaciones por su facilidad y rapidez en obtener la estimación de la biomasa microbiana comparado con los 10 días de incubación que se requiere con el método de cloroformo fumigación-incubación.

¹ rsivila@caoba.entelnet.bo Instituto de Ecología- Proyecto Tropandes
² guerreropostigo@yahoo.com Laboratorio de Calidad Ambiental – I.E.

La relación entre la biomasa microbiana y la fertilidad no es directa; mas bien depende de un equilibrio entre la inmovilización y la mineralización que está determinada principalmente por la calidad y la cantidad de los substratos descompuestos. (Reyes & Vargas). Sarmiento, L. (1995), analizan la dinámica de la biomasa microbiana ligada a la restauración de la fertilidad y sus resultados indican que el papel beneficioso del descanso sobre la fertilidad del suelo está muy ligado al aumento de la biomasa microbiana del suelo, y que podría ser un indicador de la restauración de la fertilidad.

Trabajos pioneros en la medición del nitrógeno de la biomasa microbiana del suelo con el método de cloroformo fumigación extracción (CFE-N) en suelos bolivianos sin fertilizar y bajo vegetación nativa propia del descanso han sido examinados en forma diacrónica y sincrónica (Sivila & Angulo, 2001)

El objetivo del presente trabajo es estimar la dinámica de la fertilidad del suelo a través de la evaluación de la biomasa microbiana del suelo por el método de cloroformo fumigación-extracción (CFE-N) en un ciclo de rotación de cultivo papa – cebada en una parcela de la región de Patarani (altiplano central boliviano).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las determinaciones de las características físico-químicas del suelo en estudio fueron analizadas en el laboratorio de calidad ambiental del Instituto de Ecología de la Paz y la biomasa microbiana del suelo se realizó en el laboratorio de microbiología del suelo del Instituto de Ecología.

Área de Estudio

Las mediciones de la biomasa microbiana del suelo se llevaron a cabo en la parcela de un agricultor campesino de la región altiplánica. La parcela experimental se encuentra a 3600 msnm en la comunidad de Patarani (provincia Aroma del departamento de La Paz). El clima de la región es propio de la Puna: árida y seca (450 mm de precipitación).

La parcela en estudio es de aproximadamente 150 m², análisis físico del suelo reporta un análisis estructural areno franco (arena 71.7 %; limo 23.0 %; arcilla 5,3 %), en el horizonte superficial de 20-25 cm. Al inicio del estudio la parcela presentaba cinco años de descanso con la vegetación típica del descanso: *Nassella pubiflora*, *Boutelloua simplex*, *Oxalis bisfracta*, *Arístida aplundii*.

Muestreo

La recolección de muestras de suelo para determinar la biomasa microbiana y la actividad microbiana se realizó de 0 a 20 cm de profundidad. Se tomaron muestras a diferentes distancias y en forma aleatoria que constituyeron una muestra compuesta. Las muestras fueron transportadas con los cuidados necesarios para evitar alteraciones y se analizó dentro de las 24 horas. En cada época muestreada se realizaron tres repeticiones.

Las muestras llegada del campo se tamizaron inmediatamente (malla 2 mm), extrayéndose restos vegetales, minerales o de fauna que pudieran arrojar errores en los resultados. Se determinó la humedad, por el método gravimétrico, en submuestras replicadas.

Las muestras de suelo para los diferentes análisis realizados se tomaron en la misma parcela en las siguientes etapas del ciclo de rotación: durante el descanso; en la siembra del primer cultivo (papa) (*Solanum tuberosum ssp variedad Gendarme*); en pleno cultivo; en la cosecha de la papa; durante la siembra del segundo cultivo (cebada) (*Hordeum vulgare*); en pleno cultivo y en la cosecha de la cebada.

Biomasa Microbiana

a. Preparación y extracción

Las muestras de suelos llegadas al laboratorio se guardan de inmediato bajo refrigeración (4° C) y se procesan a la mayor brevedad posible, con la finalidad de disminuir la actividad y detener el crecimiento de la población microbiana. Las muestras se someten a extracción estando húmedas.

La determinación del nitrógeno de la biomasa microbiana, se realizó por el método de cloroformo – fumigación - extracción (CFE-N). Se siguió el procedimiento de Broques et al. (1985) y Acevedo, D. (1994) con modificaciones.

De cada muestra se pesan seis submuestras de 50 g de suelo húmedo, tres para fumigar y tres para los controles. En un desecador de vidrio para vacío se coloca un recipiente con 25 ml de cloroformo libre de etanol, las muestras de suelo a ser fumigadas se acondicionaron en el desecador haciendo pisos separados. Las paredes laterales del desecador se cubren con papel absorbente embebidos en agua para mantener la humedad de las muestras durante los ensayos. Se hace vacío por espacio de 15 minutos con ayuda de la bomba de agua, cerrando la llave del desecador y se deja actuar al biocida durante 24 horas a temperatura ambiente.

Concluida la fumigación se elimina el cloroformo de la atmósfera del suelo éste se transfiere a recipientes herméticos para realizar la extracción con 150 ml de 0,5 M de K₂SO₄ y 30 minutos de agitación. Con una centrifugación de 15 minutos a 4000 rpm se separa el extracto para analizar el nitrógeno. Para los controles del método, en forma paralela, se preparan otros recipientes con suelo sin fumigar. A cada recipiente se le agregó 150 ml de 1.0 M de K₂SO₄. Se agitaron durante 30 minutos y el contenido, después de centrifugar se filtra por papel whatman # 42. El extracto se emplea para cuantificar el nitrógeno de la biomasa microbiana por el método de Kjeldahl.

b. Determinación de nitrógeno

De cada extracto obtenido se transfieren 100 ml a un tubo de Kjeldahl, se agrega 5 ml de H₂SO₄ cc y 1 g de muestra reactiva de selenio, se coloca el matraz kjeldahl en el digestor kjeldahl programando el instrumento con los siguiente tiempos y temperaturas:

- Rampa Set 1 - 45 min a 140 °C
- Set 2 - 25 min a 175 °C
- Set 3 - 10 min a 310 °C
- Set 4 - 65 min a 370 °C

Al término de la digestión y después de enfriar y se agrega 20 ml de agua bidestilada de modo que limpie las salpicaduras del matraz. Se introduce el matraz en el aparato de destilación kjeldahl y a continuación bajo el refrigerante se coloca el matraz erlenmeyer de 100 ml, con 5 ml de indicador ácido bórico. Se agrega 20 ml de NaOH 10 N al matraz kjeldahl, destilando hasta obtener aproximadamente un volumen de 100 ml. Se titula el destilado con la solución de ácido sulfúrico 0.01 N, el punto final de la titulación se observa con el cambio de color de verde a rosado, el nitrógeno evaluado es el nitrógeno total de la solución.

Actividad microbiana

La biomasa microbiana y la respiración son dos parámetros complementarios para estudiar la microbiota del suelo, indican la abundancia y la actividad microbiana. De esta manera se evaluó también este parámetro.

La estimación de la actividad microbiana se determinó por el método de la respiración edáfica en jarras herméticas. Se tomaron tres submuestras tamizadas de suelo de 50 g cada uno y junto con un recipiente que contenía 10 ml de una solución 1 N de OHNa, se colocaron en las jarras. Al final del ensayo se añadió 2 ml de BaCl₂. 2H₂O 0.5 M. El CO₂ desprendido es atrapado en la solución alcalina, que posteriormente se titula con solución 1N de HCl en presencia de fenolftaleína como indicador.(Nannipieri, et al. 1990; Alef K. 1995)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En EL Cuadro 1 se exponen las características mas importantes de la parcela en el momento de la toma de muestras de suelo. Las fechas de los muestreos indican el seguimiento de la fertilidad en las diferentes etapas del estudio.

Cuadro 1. Características de la Parcela en Estudio en las Diferentes Fechas de Muestreo

Estado	En descanso	Roturada	Siembra 1°cultivo	Pleno Cultivo	Cosecha	Siembra 2°cultivo	Pleno Cultivo	Cosecha
Características	5 años	Suelo estabilizado	Papa dulce	Máximo desfoliar	Suelo y tubérculos	Cebada	En macollo	Suelo con Agua
Fecha	02/99*	04 / 99	11 / 99	04/2000	05/ 2000	11/2001	02/2001	04/2001

*Determinado en IIAG (España)

La rotación de cultivos en la comunidad de Patarani es por lo general papa - cebada y en algunos años papa-cebada-quinua. El promedio del descanso de las parcelas en Patarani es aproximadamente entre 7 y 8 años; sin embargo por presiones de diferente orden, se rotura también a los 5 años como es el caso de la parcela del presente estudio. El suelo de la parcela en descanso fue analizada en el Instituto de investigaciones agrobiológicas de Galicia (España) y presentaba las siguientes características: pH 6.9 ± 0.1 ; carbono orgánico C% 0.47 ± 0.01 ; Contenido de nitrógeno N % 0.064 ± 0.007 y una actividad microbiana 6.44 (J.M. Acea; S. Gonzáles. com. Pers).

La roturación fue efectuada unas semanas antes del primer muestreo, considerado un periodo suficiente para la estabilidad del suelo. En la época de la siembra de papa el muestreo se realizó antes de la incorporación del guano (ovino). Durante el crecimiento del primer cultivo, cuando se desarrolló lo máximo de la biomasa aérea fue cuando se tomó la muestra de suelo para los análisis. En la cosecha de papa, la muestra de suelo se recolectó al mismo tiempo que la cosecha de tubérculos. El muestreo del suelo en el segundo cultivo con cebada se llevó a cabo normalmente salvo en la época de cosecha donde debido a las excesivas lluvias el suelo presentaba bastante humedad.

En los Cuadros 3 y 4, se presentan el resultado del análisis químico de los nutrientes mas importantes y de acuerdo a estos valores la clasificación del suelos en las diferentes etapas de estudio. Se deduce que el suelo, del presente estudio, es por lo general de bajo a muy bajo en contenido de nutrientes.

Los valores del análisis de la cosecha II, como se explicó líneas arriba, este cultivo (cebada) se encontraba con bastante humedad cuando se tomó la muestra para el análisis, este cultivo creció sin limitación de agua, condiciones raras en el altiplano, posiblemente estas circunstancias favorecieron el crecimiento y abundancia de los microorganismos del suelo que se refleja en el valor de la biomasa microbiana (Cuadro 4), como se explica mas adelante.

Cuadro 2. Análisis Químico del Suelo de la Parcela en las Diferentes Épocas del Estudio

Suelo estudiado	PH	Mat. Org %	Carb. Org %	Nitrógeno %	Fósforo mg/kg	CIC meq/100g
Pleno Cultivo I	6.2	0.69	0.4	0.049	9.5	4.2
Cosecha I	6.0	0.63	0.37	0.054	5.4	3.3
Siembra Cultivo II	6.4	0.75	0.44	0.060	6.6	7.2
Pleno Cultivo II	6.7	0.71	0.41	0.055	12.0	6.0
Cosecha II	6.2	1.1	0.62	0.081	15.0	3.0

Cuadro 3. Clasificación de el Suelo en Estudio en Base al Análisis Químico

Tipo de suelos estudiado	PH	Contenido de materia orgánica	Contenido de nitrógeno	Contenido de fósforo	CIC
Pleno Cultivo I	Débilmente Ácido	Muy bajo	Muy bajo	Bajo	Muy bajo
Cosecha I	Débilmente Ácido	Muy bajo	Bajo	Bajo	Muy bajo
Siembra Cultivo II	Débilmente Ácido	Muy bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Pleno Cultivo II	Neutro	Muy bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Cosecha II	Débilmente Ácido	Bajo	Bajo	Bajo	Muy bajo

En los Cuadros 4 y 5 se exponen los resultados de la valoración de la biomasa microbiana y de la respiración microbiana respectivamente. La biomasa microbiana representa la actividad potencial y presenta el valor mas bajo en el cultivo de papa cuando la planta expresa su máximo desarrollo foliar. En cambio la respiración microbiana, que representa la actividad real, los valores mas bajos se obtienen en la etapa de siembra y valores superiores en las cosechas. Sin embargo se observa la tendencia a incrementar su valor desde la siembra a la cosecha en ambos cultivos.

Cuadro 4. Valores Estimados de la Biomasa Microbiana del Suelo por el Método de Fumigación Extracción (mg N/Kg suelo seco)

Característica	Siembra 1	Cultivo 1	Cosecha 1	Siembra II	Cultivo II	Cosecha II
Promedio	12.4	8.2	20.4	6.3	20.7	22.0
D. S	0.4	5.4	3.46	4.5	0.98	0.9
E .S	0.23	3.11	1.99	2.39	0.56	0.52
Cof. Var. %	3.2	65.8	16.9	65.8	4.0	4.1

Cuadro 5. Valores Estimados de la Actividad Microbiana por el Método de Respiración (mg CO₂/50 g suelo seco)

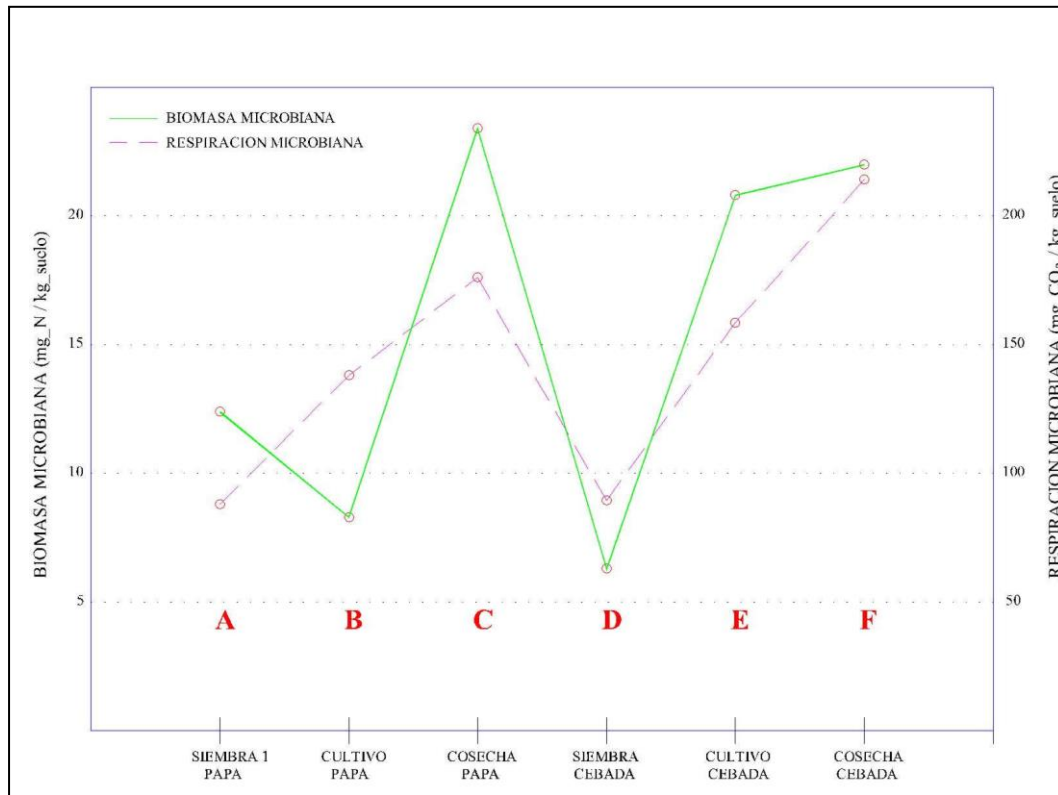
Característica	Siembra 1	Cultivo 1	Cosecha 1	Siembra II	Cultivo II	Cosecha II
Promedio	4.4	6.9	8.8	4.5	7.7	11
D. S	1.1	2.3	2.2	1.1	2.1	1.3
E .S	0.63	1.3	1.3	0.63	0.59	0.79
Cof. Var. %	25	33	25	24	27	12

En la Figura 1 se observa las fluctuaciones de la biomasa microbiana del suelo y de la respiración microbiana, durante el tiempo transcurrido entre el muestreo de la primera siembra (papa) en noviembre de 1999 y el último muestreo en la cosecha del segundo cultivo de la rotación (cebada) en mayo del 2001.

La biomasa microbiana del suelo que representa la actividad potencial y la respiración microbiana la actividad real, se interpreta la figura 1 como el comportamiento de ambas a lo largo de los puntos identificados en la figura que corresponden a las diferentes etapas del ciclo de rotación examinado.

La actividad potencial y la actividad real parecen estar sincronizados en casi todas las etapas analizadas. Sin embargo la biomasa en el cultivo de papa presenta un comportamiento diferente en las dos primeras etapas, del punto A al punto B de la figura 1, la actividad real tiene una tendencia a incrementar su valor hasta el punto C; en tanto que la biomasa microbiana tiende a disminuir a medida que progresa el desarrollo del cultivo, punto B de la figura que representa el máximo desarrollo foliar alcanzado.

Figura 1. Comportamiento de la biomasa microbiana y de la respiración microbiana evaluada en las diferentes épocas



Consecuentes con la hipótesis, planteada por varios investigadores (Sarmento, 1995; García & Morón, 1992; Smith et al. 1990), que la biomasa microbiana constituyen un reservorio lábil de elementos nutritivos y que pueden liberar los nutrientes a la solución del suelo durante el cultivo. Suponemos que la disminución que experimenta la biomasa microbiana, en la es debido a algún mecanismo aún no conocido, que se da en el ecosistema rizosférico de la papa entre raíz y microorganismos, de esta manera gran parte de los nutrientes necesarios para el cultivo son proporcionados por los microorganismos de la biomasa microbiana. En cuanto al aumento de la actividad real se asume como parte del mecanismo para la movilización de los nutrientes.

La recuperación de la biomasa microbiana de abril a mayo, del punto B al punto C, que representa al cultivo de papa en estado de maduración, probablemente la biomasa edáfica se multiplica con los nutrientes que el cultivo ya no los necesita.

Entre el punto C y D de la figura 1 se observa una disminución de la biomasa microbiana, debido a varios factores: el abandono del cultivo después de la cosecha, los meses fríos y secos del invierno, las heladas y el suelo desnudo en el periodo de 7 meses que separan hasta la siguiente siembra (cebada) y que puede asociarse a la muerte de los microorganismos. En los modelos de simulación de reciclaje de nutrientes de la biomasa microbiana se incluyen los efectos de las condiciones ambientales (Van Vem et al. 1984). En este caso tanto la actividad real como la actividad potencial tienen el mismo efecto.

Desde la siembra de cebada (punto D) se nota la recuperación de la biomasa microbiana y su actividad debido probablemente al cultivo subsiguiente (cebada) y a la cobertura vegetal natural, donde el aporte de raíces vivas son fuente de nutrientes carbonosos que llegan a los microorganismos a través de exudados radicales, descamaciones, residuos orgánicos acumulados etc. En este segundo cultivo de la rotación parecería que la biomasa microbiana tiene otro comportamiento diferente que para el cultivo de cabecera.

En la figura 2 se muestra las fluctuaciones del fósforo disponible y nitrógeno total del suelo en el ciclo. Como se observa los dos parámetros siguen comportamientos diferentes a la biomasa microbiana y actividad microbiana, debido a que la relación entre la biomasa microbiana y la fertilidad química no es directa; mas bien depende de un equilibrio entre la inmovilización como biomasa microbiana y la mineralización (actividad microbiana real) que está determinada principalmente por la calidad y la cantidad de los substratos descompuestos.

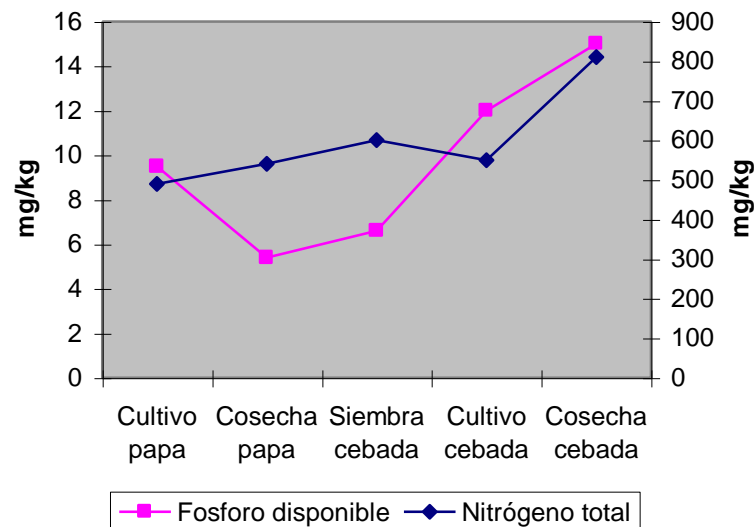


Figura 2. Fluctuaciones de Fósforo Disponible y Nitrógeno Total en Todo en Ciclo

CONCLUSIONES

Llama la atención que en los suelos del altiplano boliviano tan pobres en contenido de nutrientes, el cultivo de papa, sin fertilización química, aún presenta rendimientos (6.1 ton/Ha, en este estudio) como para abastecer a la familia rural campesina.

Los resultados de este trabajo muestran el papel que podrían estar desempeñando los microorganismos del suelo inmovilizados como biomasa microbiana. Esta biomasa puede ser cuantificada con el método del cloroformo fumigación extracción (CFE-N). Asimismo, bajo las condiciones específicas en las que se realizó el presente estudio, puede concluirse que:

- a) El N en la biomasa microbiana del suelo de la parcela en estudio y bajo una rotación de papa-cebada , presentó valores entre 6.3 mgN/kg suelo y 22.0 mgN/kg suelo seco.
- b) La dinámica de la fertilidad expresada como biomasa microbiana (actividad potencial) presenta una disminución desde la siembra del primer cultivo hasta un mes antes de la cosecha y no se descarta el papel que puede estar desempeñando la biomasa microbiana como reservorio de nutrientes potencialmente disponible en el primer cultivo de la rotación.

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, D. (1994). Metodología para la Determinación del Nitrógeno en Materiales Ecológicos . Universidad de los Andes. Centro de Investigaciones Ecológicas de las Andes Tropicales. Mérida, Venezuela. 26pp.
- ANDERSON, J.P.; DOMSCH, K.H. (1978). A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 10: 215- 221.
- ALEF, K. (1995) Soil respiration. In: Alef, K & Nannipieri P. (eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. San Diego. 576pp
- BROOKES, P.C., LANDMAN, A., PRUDEN, G. AND JENKINSON, D. S. (1985). Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 17: 837-842.
- BROOKES, P.C.; KRAGT, J.F. POWLSON, D.S. AND JENKINSON, D.S. (1985). Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: the effects of fumigation time of temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 831-835
- FRANZLUEBBERS, A.J.; HANEY, R.L.; HONS F.M. (1999). Relationships of cloroform fumigation-incubatio to soil organic matter pools. *Soil Biology and Biochemistry* , 31: 395-405.
- GARCÍA, A & MORÓN A. (1992). Estudio de C,N yP en la biomasa microbiana del suelo en tres sistemas de rotación agrícola. *Revista INAI investigación Agronómica* No. 1 tomo 1, 11-126.
- JENKINSON, D. S. & POWLSON, D. S. (1976). The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. 24: 675-683.
- MARTENS, R. 1995. Currents methods for measuring microbial biomass C in Soil: Potentials and limitations. *Biological Fertility Soils* 19: 87-99
- NANNIPIERI, P.; GRECO, S.; CECCANTI, B. (1990) . Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry*, vol 6. Bollag, JM; Stotzky G (eds). Marcel Dekker, New York, pp 293-355.
- SARMIENTO L. (1995). Restauration de la fertilité dans un systeme agricole a jachère longue des hautes Andes du Venezuela. Tesis de doctorado, Université de Paris XI, 273 p
- SIVILA R. & ANGULO W. (2001). Efecto del descanso sobre la microbiota del suelo. EN: *Ecología en Bolivia*, Numero especial, Proyecto Tropandes (in press).
- MARUMOTO, T.; ANDERSON, J.P.; DOMSCH, K.H. (1982). Mineralization of nutrients from soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*., 14 :469-475.
- SMITH, L.L. & PAUL, E.A. (1990) The significance of soil microbial biomass estimations. Pag 357-396 in J.M. Bollag and G. Stotzky, eds. *Soil Biol. Biochemistry*. Vol 6. Marcel Dekker, Inc., New York. NY.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P. C. AND JENKINSON, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703-707.

VISSER, S. ;PARKINSON, D. 1992. Soil biological criteria as indicator of soil quality: Soil microorganism. American. Journal Alternative Agriculture 7: 33-37.
WEBSTER, J. J., HAMPTON, G.J. AND LEACH, F.R. (1984). ATP in soil: A new extract and extraction procedure. Soil Biology and Biochemistry. 16: 335-342.

AGRADECIMIENTOS

Debemos agradecer al Proyecto TROPANDES (ERBIC 18-CT98_ 0263) por el equipamiento para la valoración de la biomasa microbiana edáfica. Así mismo se agradece a la Dra. Lina Sarmiento por la implementación de la técnica en el laboratorio.