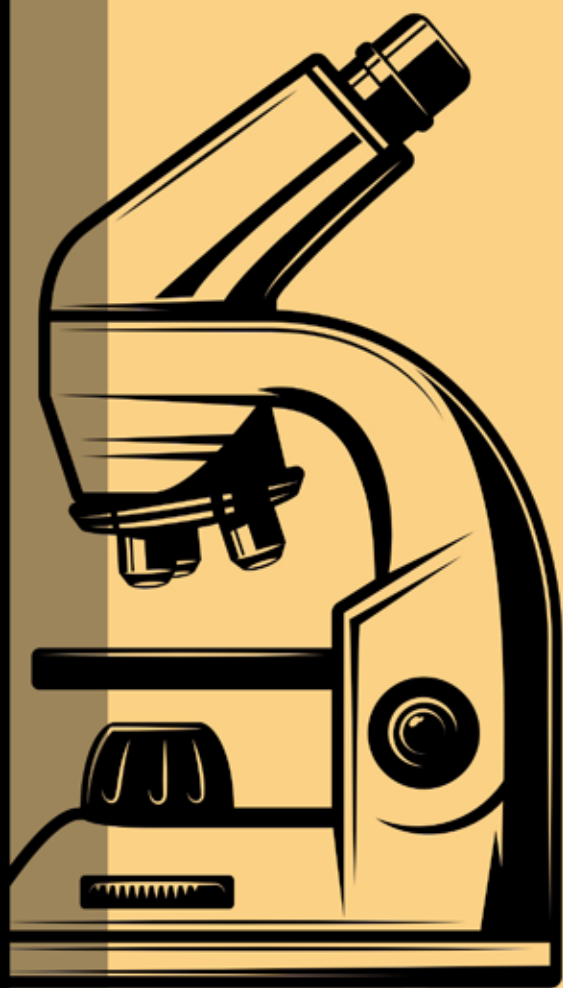


Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (CP 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Agradecimientos

Queremos agradecer a todos los autores y las autoras del libro que brindaron su tiempo y conocimiento para el bien común, compartiendo las experiencias de su trabajo en laboratorios de nuestra región.

A todas las personas que nos formaron profesionalmente y nos ayudaron a descubrir la importancia del cuidado de la vida del suelo y del trabajo interinstitucional para cambiar nuestro entorno.

A la dirección del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo por el apoyo académico y económico para la realización de esta obra.

A los/as productores/as agropecuarios/as que luchan día a día para cambiar la forma de producción y dejar la mejor herencia: «suelos vivos».

A Eudene por darnos la oportunidad de realizar este libro que creemos será de gran impacto para nuestra área de estudio.

PRESENTACIÓN	12
---------------------------	----

PARTE 1. Muestreo	13
--------------------------------	----

Capítulo 1. Muestreo de suelo para análisis biológicos

Sebastián Carnicer, Amalia M. E. Romero y Julieta Rojas

1.1. Delimitación de la unidad de muestreo	18
1.1.1. Topografía, vegetación e historia del lote	18
1.1.2. Situaciones no representativas o especiales	19
1.2. Época y momento de muestreo	19
1.3. Frecuencia de muestreo	20
1.4. Profundidad de muestreo	20
1.5. Muestreo simple y compuesto	21
1.6. Número de submuestras	22
1.7. Metodología de muestreo	23
1.8. Casos especiales	24
1.8.1. Muestreo para lípidos	24
1.8.2. Muestreo para actividad microbiana relacionada a especies arbóreas	25
1.9. Elementos y materiales necesarios para el muestreo	25
1.10. Operación de toma de la muestra	27

Capítulo 2. La precisión y exactitud en los análisis de suelo

Sebastián Carnicer y Mario R. Delfino

2.1. Precisión y exactitud	33
2.2. Error aleatorio y sistemático	35
2.3. Controles internos y externos	36

Capítulo 3. Aislamiento, identificación y conservación de rizobios

Andrea A. Sirio y Karina R. Ávalos Llano

3.1. Fundamento del método	39
3.2. Objetivos de la determinación	40
3.3. Equipamientos, materiales y reactivos	40
3.4. Procedimiento.....	41
3.4.1. Muestreo de suelo	42
3.4.2. Recolección de nódulos	43
3.4.3. Conservación de nódulos	44
3.4.4. Acondicionamiento de los nódulos.....	44
3.4.5. Procesamiento de los nódulos.....	45
3.4.6. Aislamiento de los rizobios.....	45
3.4.7. Identificación presuntiva de los rizobios aislados.....	47
3.4.7.1. Tiempo de crecimiento y producción de ácidos/ álcalis.....	47
3.4.7.2. Morfología colonial	48
3.4.7.3. Tinción diferencial.....	48
3.4.8. Conservación del cultivo puro.....	49
3.4.8.1. Tubos-agar inclinado	49
3.4.8.2. Placas de Petri	50
3.4.8.3. Criopreservación.....	50
3.4.9. Preparación del inoculante	51
3.4.10. Autenticación del rizobio: prueba en planta.....	52
3.4.10.1. Prueba en planta en sustrato estéril	54
3.4.10.2. Prueba en planta en medio Jensen	55

PARTE 2. Determinación de la actividad biológica

Capítulo 1. Medición de la actividad respiratoria para detectar actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero, Cecilia Martin y

María C. Iglesias

1.1. Fundamento del método	59
1.2. Objetivo de la determinación	59
1.3. Equipamiento.....	59
1.4. Reactivos.....	60
1.5. Acondicionamiento del material.....	60
1.6. Procedimiento	60
1.6.1. Humedecimiento de la muestra a incubar.....	60
1.6.2. Armado de los dispositivos de incubación	60
1.6.2.1. Incubación.....	61
1.6.2.2. Titulación	61
1.7. Cálculos	61
1.7.1. Resultados obtenidos en la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE	62

1.7.1.1. Determinación de respiración para detectar diferencias entre manejos agrícolas	62
1.7.1.2. Actividad respiratoria en suelos con diferentes manejos agrícolas (Biospas)	63
1.7.1.3. Ensayo de utilización de abonos orgánicos en producción hortícola	65

Capítulo 2. Carbono de la biomasa microbiana del suelo. Método de fumigación-extracción

Cristina E. Sotelo, Andrea A. Sirio y Germán L. Pérez

2.1. Fundamento del método	70
2.2. Objetivo de la determinación.....	72
2.3. Equipamiento	73
2.4. Reactivos y preparación de soluciones.....	73
2.5. Acondicionamiento del material	74
2.6. Procedimiento	74
2.6.1. Curva patrón	74
2.6.2. Obtención del extracto de la muestra	76
2.6.3. Digestión del extracto y lectura en el espectrofotómetro...77	
2.7. Cálculos.....	78

Capítulo 3. Actividad hidrolítica de enzimas microbianas sobre diacetato de fluoresceína

Natalia Mansilla, Cristina E. Sotelo, Natalia Banegas, Andrea A. Sirio y Emilce Viruel

3.1. Fundamento del método	84
3.2. Objetivo de la determinación.....	84
3.3. Equipamiento y materiales.....	85
3.4. Reactivos	85
3.5. Preparación de las soluciones	85
3.6. Acondicionamiento del material.....	86
3.7. Procedimiento	86
3.7.1. Curva patrón.....	86
3.7.2. Determinación en muestras.....	87
3.8. Cálculos	88

Capítulo 4. Actividad de las enzimas fosfatasas del suelo

Marcela Toledo

4.1. Determinación de la actividad de las enzimas fosfatasas	95
4.2. Fundamento del método.....	97
4.3. Objetivo de la determinación.....	99
4.4. Equipamiento	99
4.5. Reactivos de calidad proanálisis.....	99
4.6. Acondicionamiento del material.....	100

4.6.1. Toma y acondicionamiento de muestras de suelo	100
4.7. Procedimiento	101
4.8. Preparación de soluciones.....	103
4.9. Cálculo de la actividad de las fosfatasas e interpretación de resultados	104

PARTE 3. Grupos funcionales

Capítulo 1. Determinación de nitrógeno en forma de amonio a partir de la actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, José M. Recalde, Amalia M. E. Romero, Amilcar Correa, Daniela González, Mariana Ferreira y María C. Iglesias

1.1. Determinación de la producción de amonio a partir de la actividad amonificante	117
1.1.1. Fundamento del método	117
1.1.2. Objetivo de la determinación	117
1.1.3. Equipamiento.....	117
1.1.4. Reactivos.....	117
1.1.5. Acondicionamiento del material.....	118
1.1.6. Procedimiento	118
1.1.6.1. Confección de la curva de calibración	118
1.1.6.2.. Procedimiento con muestras de suelo.....	119
1.1.7. Cálculos	120
1.1.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.....	121
1.2. Determinación de la producción de amonio a partir de la fijación biológica del N ₂	125
1.2.1. Fundamento del método	125
1.2.2. Objetivo de la determinación.....	125
1.2.3. Equipamiento	125
1.2.4. Reactivos	125
1.2.5. Acondicionamiento del material.....	125
1.2.6. Procedimiento.....	126
1.2.7. Cálculos.....	126
1.2.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.....	127

Capítulo 2. Capacidad celulolítica del suelo en aerobiosis

María C. Iglesias, Amalia M. E. Romero y Marcela R. Cossoli

2.1. Fundamento de los métodos	131
2.1.1. Placa de suelo con microdiscos de papel de filtros	131
2.1.1.1. Objetivo de la determinación.....	132
2.1.1.2. Equipamiento y materiales	132
2.1.1.3. Acondicionamiento del suelo	132

2.1.1.4. Cuento de los microdiscos.....	133
2.1.2. Minired con celulosa en bandejas de suelo	134
2.1.2.1. Objetivo de la determinación	134
2.1.2.2. Equipamiento y materiales.....	134
2.1.2.3. Procedimiento.....	134
2.1.3. Redes de degradación con celulosa - <i>litter bag</i>	135
2.1.3.1. Objetivo de la determinación	135
2.1.3.2. Materiales y herramientas.....	135
2.1.3.3. Procedimiento.....	136
2.2. Cálculos	137
2.2.1. Ejemplos	137
2.3. Otras consideraciones	140

Capítulo 3. Determinación de infección micorrízica

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero, M. Amilcar Correa, Matías H. Serafini y María C. Iglesias

3.1. Fundamento del método	144
3.2. Objetivo de la determinación.....	144
3.3. Equipamiento	144
3.4. Reactivos	144
3.5. Acondicionamiento del material	145
3.6. Procedimiento.....	145
3.6.1. Tinción de las raíces.....	145
3.6.2. Observación microscópica.....	146
3.7. Cálculos	147
3.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.....	148

Capítulo 4. Determinación de las proteínas del suelo reactivas a Bradford-BRSP (glomalina)

Germán L. Pérez, Andrea A. Sirio, Cristina E. Sotelo y Sebastián Carnicer

4.1. Fundamento del método	154
4.2. Objetivos de la determinación	155
4.3. Equipamiento y materiales.....	156
4.3.1. Confección de la curva patrón	156
4.3.2. Extracción de Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) y Glomalina Total (GT).....	156
4.3.3. Lectura de las muestras	156
4.3.4. Recomendaciones preanalíticas.....	156
4.4. Preparación de soluciones.....	157
4.5. Procedimiento.....	158
4.5.1. Confección de la curva patrón y lectura de muestras	159
4.5.2. Procedimiento de extracción y medición de glomalina...160	
4.5.3. Extracción y determinación de GFE.....	161
4.5.4. Extracción y determinación de GT (glomalina total).....	162
4.6. Cálculos	163

Capítulo 5. Nitrógeno mineralizado en anaerobiosis (Nan).
Método de incubación anaeróbica

*Silvia A. Arzuaga, Cristina E. Sotelo, Stella M. Contreras Leiva y
Marcela Toledo*

5.1. Fundamento del método	168
5.2. Objetivo de la determinación.....	169
5.3. Equipamiento y materiales	169
5.4. Reactivos proanálisis.....	170
5.5. Condiciones ambientales del lugar de trabajo y medidas de seguridad del personal de laboratorio	170
5.6. Acondicionamiento del material de laboratorio	171
5.7. Preparación de las muestras de suelo para el análisis.....	171
5.8. Preparación de soluciones.....	171
5.9. Determinación del factor de humedad del suelo.....	173
5.10. Procedimiento	173
5.10.1. Determinación de nitrógeno inicial (N inicial).....	173
5.10.2. Determinación de nitrógeno incubado	175
5.10.3. Determinación de Nitrógeno anaeróbico (Nan)	176
5.11. Cálculos.....	176

PARTE 4. Técnicas moleculares para evaluar la comunidad
microbiana del suelo

Capítulo 1. Técnicas moleculares para evaluar la comunidad
microbiana del suelo

Daniel H. Grasso y Mónica M. Collavino

1.1. Objetivo de la determinación	186
1.2. Extracción y purificación de ADN de muestras de suelo	186
1.2.1. Materiales.....	187
1.2.2. Procedimiento.....	187
1.2.3. Rendimiento	188
1.3. Análisis de la diversidad bacteriana de suelo: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) y Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	188
1.3.1. DGGE.....	189
1.3.1.1. Fundamento del método.....	190
1.3.1.2. Protocolo	190
1.3.1.3. Equipamiento específico	191
1.3.1.4. Materiales	191
1.3.1.5. Soluciones.....	192
1.3.1.6. Armado del gel	193
1.3.1.7. Preparación de las soluciones desnaturizantes..	194
1.3.1.8. Formación del gradiente	195

1.3.1.9. Gel de apilamiento	196
1.3.1.10. Electroforesis.....	196
1.3.1.11. Finalización de la electroforesis	197
1.3.1.12. Tinción.....	198
1.3.1.13. Extracción de las bandas y reamplificación.....	198
1.3.1.14. Análisis del gel.....	199
1.3.2. T-RFLP.....	200
1.3.2.1. Fundamento	200
1.3.2.2. Diseño/elección de cebadores para la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	201
1.3.2.3. Generación de Terminal Restriction Fragments (T-RFS) por digestión con Enzimas de Restricción (ER).....	201
1.3.2.4. Análisis de los productos obtenidos	202
1.3.2.5. Protocolo.....	202
1.3.2.6. Soluciones y equipamiento	202
1.3.2.7. Cebadores de oligonucleótidos.....	203
1.3.2.8. Procedimiento.....	203
1.3.2.8.1. Amplificación por PCR	203
1.3.2.8.2. Digestión y separación de los amplicones de PCR con enzimas de restricción	205
1.3.2.8.3. Análisis de datos.....	206

Presentación

Es grato saludar la publicación de este manual de técnicas de determinación de parámetros biológicos que refleja el impacto de diversas prácticas de uso y manejo de los suelos, así como efectos de las condiciones ambientales sobre la actividad de los mismos.

Estos cambios en la calidad de los agroecosistemas pueden ser evaluados por indicadores que incluyen parámetros biológicos (recuentos, biomasa microbiana, enzimas, respiración y N mineralizable), a los que se han agregado aquellos métodos genéticos que analizan la presencia de microorganismos sin aislarlos (biodiversidad).

Numerosos son los estudios actuales relativos a la selección de parámetros que respondan, en forma rápida y segura, a los cambios que permitan tomar acciones correctivas y que se correlacionen con las clásicas determinaciones físicas y químicas. Un tema importante en esta área es la determinación de los valores que se consideran deseables, los de un suelo saludable (niveles umbral o límites críticos), a diferentes intervalos de tiempo, en el agroecosistema seleccionado. En general, el umbral de comparación se obtiene de los ecosistemas no perturbados. En áreas donde no se encuentran ecosistemas naturales, el establecimiento de los umbrales de equilibrios o deseables de un indicador se efectúa a partir de valores medios resultantes de estudios realizados con anterioridad, en los mismos suelos, lo que constituye una limitante en muchos casos.

Este libro tiene como objetivo principal exponer con claridad los métodos de análisis biológicos de suelo descritos en cada capítulo. El texto constituye una valiosa contribución a la evaluación de un grupo de parámetros biológicos que han sido aplicados y ajustados a diversos sistemas agrícolas del país por numerosos grupos de investigadores, incluidos los autores de los distintos capítulos.

Los autores de este manual cuentan con amplia experiencia en el tema, por lo que su contribución será, sin duda, muy bien acogida por estudiantes y docentes.

Dra. Lillian Frioni



Muestreo

PARTE 1

Capítulo 1. Muestreo de suelo para análisis biológicos

Sebastián Carnicer, Amalia M. E. Romero
y Julieta Rojas

La calidad del suelo es un concepto multidimensional que puede ser evaluado desde diversos enfoques, tanto en agroecosistemas, con énfasis en el servicio ecosistémico de provisión con el foco principal en la productividad, como en ecosistemas naturales donde los principales objetivos son mantener la calidad ambiental y conservar la biodiversidad (Bünemann *et al.*, 2018). Desde el punto de vista netamente productivo, con la finalidad de maximizar la producción, la calidad del suelo se define como su capacidad o aptitud para soportar el crecimiento de las plantas sin que esto provoque la degradación del suelo o un daño ambiental (Wilson y Sasal, 2017).

Cualquiera sea el fin de la evaluación, la calidad o salud del suelo puede evaluarse a través de diversas técnicas de campo o laboratorio que incluyen análisis de las propiedades físicas, químicas y biológicas. Es dentro de estas últimas que se evalúan las poblaciones y propiedades microbianas, jugando los organismos un rol central en el funcionamiento del suelo. Por otra parte, a nivel global y a los fines prácticos de todo sistema de evaluación de calidad del suelo, se han establecido diversos criterios para seleccionar indicadores de calidad de suelos entre los diversos parámetros a ser determinados. Estos criterios son: que se encuentren relacionados a funciones del suelo y procesos ecosistémicos, que permitan la estimación de propiedades y funciones difícilmente mensurables, que sean fáciles de muestrear y medir (simples y prácticos), que sean sensibles temporal y espacialmente, y que sean fáciles de interpretar (Bünemann *et al.*, 2018).

El suelo es considerado un cuerpo de material heterogéneo cuyas características en el paisaje varían en sentido vertical, horizontal y temporal (Álvaro García, 2015; Friedrich, 2017; Chillón Camacho,

2018). El sentido vertical puede ser definido principalmente por sus horizontes pedogenéticos originados por los factores y procesos formadores de suelo. Dentro de las causas de variación horizontal tenemos principalmente al relieve y, por último, las temporales se deben a las condiciones estacionales del clima. Además de estas características genéticas, existen otras causas de alteración o cambio de origen antrópico que están relacionadas con el uso del suelo, las rotaciones de cultivos y especies utilizadas, la fertilización y los sistemas de labranza (Henríquez y Viloria, 1999; Martínez Cruz *et al.*, 2002; Camargo-Ricalde y Esperón-Rodríguez, 2005; Siqueira *et al.*, 2007; Osorio, 2012; Carretero *et al.*, 2016).

La evaluación de propiedades biológicas como una dimensión de la calidad del suelo es una tarea compleja ya que el mismo puede albergar, por unidad de volumen, alta biodiversidad y número de microorganismos en forma muy heterogénea; la muestra que se recolecta debe reflejar esa variabilidad, además de los impactos o las variaciones correspondientes a la situación en estudio. Se ha calculado que un gramo de suelo fértil puede contener entre 17 a 112 células microbianas y miles de especies diferentes.

Así también, la variación temporal y espacial del suelo es determinante para la medición de parámetros microbianos, dado que pueden aumentar en varios órdenes de magnitud a través de superficies menores a una hectárea o de semana a semana. Por lo tanto, cuando mayor variación espacial o temporal presente un determinado parámetro microbiano, mayor será la cantidad de muestras necesarias de ser analizadas para capturar adecuadamente esa variación y tomar decisiones robustas basadas en los resultados analíticos (Fierer *et al.*, 2021).

Nuevos enfoques de investigación centrados en la rizósfera y los *hotspots* (puntos calientes) microbianos complejizan los criterios para un muestreo representativo, ya que ponen en evidencia que no solo la dinámica de la población microbiana es función de múltiples y diversos factores naturales y antrópicos como el ambiente predominante, las prácticas de manejo del suelo y la aplicación de fertilizantes, abonos o enmiendas, entre otros, sino que además se encuentra puntualmente concentrada en regiones que representan una proporción muy pequeña respecto a la masa total del suelo (Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015; Bach *et al.*, 2018; Bilyera *et al.*, 2020). Los factores de manejo tienen efecto directo sobre la materia orgánica del suelo, sustrato sobre el que se sustenta la actividad microbiana (Ortíz-Maya *et al.*, 2017; Rosero *et al.*, 2019) y el microbioma de la rizósfera, ambiente puntual donde las plantas generan una asociación estrecha con microorganismos específicos que, influenciada por las secreciones radicales, puede contener

entre 10 y 11 células microbianas por gramo de raíz y más de 30 000 especies procariotas (Berendsen *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha determinado que, condiciones homogéneas de suelo no representan similar actividad, dada la existencia de estos *hotspots* microbianos: pequeños volúmenes de suelo con velocidades de procesos mucho más rápidas e interacciones más intensivas, comparadas con las condiciones promedio del suelo.

La actividad microbiana se encuentra limitada en todos los suelos por el carbono lábil y la energía disponible, y se han agrupado los principales *hotspots* según las fuentes de alta entrada de carbono en rizósfera, detritósfera, bioporos y la superficie de los agregados, cuya distribución e importancia depende del ecosistema y la profundidad (Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015). El tamaño de dichos *hotspots* oscilaría entre 3 y 4 órdenes de magnitud, desde pocos μm hasta varios mm, reflejando no solo la variación y las incertidumbres en la distribución espacial de los parámetros biológicos, sino también en las tasas de procesos que varían ampliamente con relación a la masa total del suelo, al que se lo ha denominado un «desierto», donde la vida se encuentra discretamente distribuida, habiéndose determinado a partir del procesamiento estadístico de imágenes en las que, para un área determinada de imagen de la rizósfera, los *hotspots* pueden hallarse ocupando entre 0,2 y 23% de la superficie total (Bilyera *et al.*, 2020; Kuzyakov y Blagodatskaya, 2015).

Por otra parte, estudios orientados a demostrar el potencial de información que poseen las fracciones de agregados del suelo demostraron que la diversidad proporcional total del suelo resulta en 65% más de riqueza bacteriana y 100% más de riqueza fúngica que el total del suelo a causa de que los agregados y los poros, dentro de ellos, generan microhábitats, donde la cantidad y el tipo de sustratos orgánicos conducen la actividad microbiana, siendo incluso diferentes las comunidades de hongos y bacterias en macro y microagregados (Bach *et al.*, 2018).

Estos autores establecen que, dada la heterogeneidad de las partículas de suelo y la abundancia relativa de microagregados, los métodos tradicionales de muestreo podrían no capturar la diversidad completa de la comunidad microbiana del suelo. Sin embargo, rescatan la utilidad de los muestreos de la masa del suelo completa para representar respuestas a diferentes manejos y la importancia de sumar nuevos enfoques para probar hipótesis con relación a la estructura de las comunidades y el reciclaje de la materia orgánica.

Por lo tanto, a causa de las diferentes fuentes de variabilidad, el muestreo de suelo se considera una herramienta crucial a la hora de realizar una evaluación apropiada de las condiciones edáficas presentes en un sitio y momento determinado. Un muestreo adecuado debe arrojar información representativa del conjunto total del suelo al que pertenece la muestra y es por este motivo que se encuentran en discusión actualmente la facilidad de interpretación y la credibilidad de las inferencias que se realizan a partir de métricas microbianas respecto del estado de salud de los suelos (Fierer *et al.*, 2021). El muestreo es el primero de una serie de pasos a la hora de evaluar o caracterizar el suelo que antecede a los procesos analíticos de caracterización y su posterior diagnóstico (Álvarez *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2016).

Actualmente, diversos trabajos orientados al estudio del microbioma del suelo, la diversidad microbiana, organismos o actividades microbianas específicas orientan el muestreo a áreas puntuales de la masa total del suelo, como la rizósfera o diversos tamaños de agregados, donde se considera que la actividad es mayor o se plantea como una hipótesis de investigación (Bach *et al.*, 2018; Maron *et al.*, 2011). Se podría en este caso considerar la masa total del suelo como otra situación de muestreo dentro del mismo estudio.

En ciencias de la tierra, por lo general, la unidad de muestreo es el lote de producción o con características ambientales específicas, pero esto dependerá de la heterogeneidad del mismo, ya que dentro de un mismo lote pueden existir diferentes unidades muestrales delimitadas, según una o varias cualidades: zona alta y baja, existencia de vegetación natural, manejos diferentes o condiciones de fertilidad contrastantes, zonas con manchones salinos, etc. (Álvarez *et al.*, 2008). Dado que la cantidad de muestra a extraer es pequeña (entre 0,5 y 1 kg), en comparación a los 2,500 Mg que pesa una hectárea en promedio, el muestreo es la etapa más crítica en un proceso evaluativo de la fertilidad (Carretero *et al.*, 2016; Conti, 2005). A su vez, a causa de que este compendio de metodologías analíticas abarca diversas formas de estudiar la actividad microbiana del suelo, es necesario considerar cómo atenuar, orientar a regiones específicas y/o tener en cuenta los factores que influyen sobre la presencia y actividad de las comunidades microbianas en el momento de muestreo, ya que de ello también depende que la muestra represente a la población o la función ecosistémica en estudio.

1.1. DELIMITACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTREO

Para delimitar una unidad de muestreo, se deben tener en cuenta la topografía (relieve), la vegetación y la historia del lote, como también las situaciones denominadas no representativas o especiales.

1.1.1. Topografía, vegetación e historia del lote

Como se mencionó anteriormente, las fuentes de variabilidad espaciales del suelo pueden ser de origen natural o antrópico. En esta etapa es muy útil contar previamente con información general de los suelos de la región (topografía). Como primer paso, se debería consultar en gabinete la información existente: cartas de suelo disponibles, series de suelo presentes, imágenes satelitales actualizadas para evaluar zonas homogéneas por vegetación o paisaje, profundidad de horizontes, textura predominante y vegetación original para definir una primera delimitación de posibles unidades muestrales. Esto facilitará las tareas posteriores en el terreno y la optimización de la cantidad de muestras a extraer (Chang *et al.*, 2006; Carretero *et al.*, 2016), lo que es relevante desde el punto de vista económico, puesto que el costo de los análisis es muchas veces un factor limitante en trabajos de investigación y extensión.

Como segundo paso, y con la información recabada, ya se puede realizar *in situ* un relevamiento para dividir el área o lote a muestrear en zonas homogéneas, de acuerdo con diferencias naturales visibles (relieve, vegetación, drenaje, erosión, ver Figura N° 1) y diferencias de manejo (rotaciones, cultivos, tipo de labranza, fertilización), que son determinantes de las propiedades edáficas actuales y de la diversidad y actividad microbiana al generar un mosaico complejo a nivel espacial (Carretero *et al.*, 2016; Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

La vegetación presente, por su lado, condiciona la actividad microbiana, a diferencia de un suelo sin vegetación, como se expresó previamente, y su presencia genera una rizósfera determinada que influye activamente en el suelo en esa zona y aumenta la complejidad del ecosistema.

El aumento de la abundancia y la actividad microbiana están dados por la liberación de carbono orgánico y otros rizodepósitos a través de los exudados radicales que son sustrato para los microorganismos que, a su vez, asisten a las plantas en la toma de nitrógeno y fósforo, en la degradación de la materia orgánica recalcitrante y en la meteorización de minerales (Berendsen, 2012). En caso de haber cultivos implantados, incluso su estado fenológico



Figura N° 1. Esquema de división en áreas homogéneas de acuerdo a la vegetación presente.

puede influir sobre los grupos microbianos presentes y la actividad de los mismos (Görres y Amador, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009; Bakker *et al.*, 2013; Tkacz *et al.*, 2015; Kaleita *et al.*, 2017).

Considerar la actividad de la rizósfera puede llevar incluso a tomar decisiones como muestrear surcos y/o entresurcos, teniendo en cuenta el objetivo del estudio. Si se realizan otras determinaciones químicas o físicas que se van a correlacionar con estas propiedades, deberían tomarse con el mismo criterio que las muestras para determinar propiedades microbianas.

1.1.2. Situaciones no representativas o especiales

Se deben evitar áreas de la unidad de muestreo cuyas características sean diferentes a la superficie general en consideración: caminos, bajo alambrados, deyecciones, aguadas, sector para la descarga de fertilizantes o todo lugar no representativo, a menos que el objetivo de la evaluación sean dichas zonas. Si existen manchones salinos u otro tipo de situación particular localizada de interés para el estudio o evaluación que se está realizando, se debe considerar cada una individualmente.

1.2. ÉPOCA Y MOMENTO DE MUESTREO

La época de muestreo está relacionada con la estacionalidad del clima predominante. La variación térmica anual y el régimen pluviométrico afectan a la temperatura y el contenido de humedad del suelo. Estos dos factores modifican la actividad microbiana, así como el tipo de especie presente en lotes con cultivos anuales.

Estas cuestiones deben considerarse a la hora de preparar un programa de muestreo, tomándose las muestras siempre en la misma época del año en el caso de monitoreos periódicos o comparaciones espaciales y, en lo posible, registrando la temperatura del suelo en el momento del muestreo (FAO-N° 56, 2006; Gómez y Paolini, 2006; Alvear *et al.*, 2007; Carretero *et al.*, 2016; Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

Es necesario que el muestreo no se realice con el suelo excesivamente húmedo ni muy seco o durante un período de sequía. Se recomienda hacerlo en situaciones hídricas próximas a la capacidad de campo, es decir, aproximadamente 48 horas después de una lluvia o de un riego de 20 mm como mínimo. Sin embargo, siempre se debe tener presente el objetivo de la evaluación, pues diferentes épocas del año pueden ser más propicias para determinados grupos, por ejemplo, las ectomicorrizas en el período de otoño-primavera.

Cualquiera sea la época en que se realice el muestreo, es importante tener en cuenta las condiciones locales del lugar al momento de efectuar conclusiones. De ser necesario, se podría plantear más de un momento de muestreo durante el año o ciclo del cultivo, debido a los cambios en la actividad microbiana frente a la variación de la temperatura y humedad en el suelo según la época, como también según el tipo de vegetación, la fenología y el estado del cultivo, como fue mencionado antes (Görres y Amador, 2017; Kaleita *et al.*, 2017).

1.3. FRECUENCIA DE MUESTREO

La frecuencia de muestreo depende mucho del tipo de estudio que se realice, ya que la actividad microbiana, como hemos mencionado, depende de varios factores, entre ellos, los estacionales.

Autores como Gómez y Paolini (2006) encontraron diferencias en ciertos parámetros bioquímicos causados por la interacción de los cambios temporales y las prácticas de manejo. Otros, como Gómez, Kruger y Sagardoy (1996), estudiaron la variación de la actividad microbiana en la secuencia soja-trigo a través de mediciones bioquímicas esporádicamente. Camargo-Ricalde y Esperón-Rodríguez (2005), por su lado, se dedicaron al efecto de la heterogeneidad espacial y estacional del suelo sobre la abundancia de esporas de hongos micorrízicos arbusculares comparando tres estaciones: lluviosa, inicio de sequía y sequía, así como también Arteaga Garibay *et al.* (2016) analizaron muestras de la rizósfera de maíz en diferentes etapas de cultivo.

Aunque la sensibilidad a los cambios es un atributo deseable para un indicador de calidad de suelos, es deseable que exista cierto intercambio entre la robustez y la variación estacional, ya que para la interpretación de los valores obtenidos es deseable la comparabilidad de los datos entre campañas (Bünemann *et al.*, 2018). Estos ejemplos anteriormente mencionados nos demuestran que el muestreo está muy relacionado con el objetivo de la investigación y que no hay un solo criterio para definirlo, más bien, depende del interés del investigador.

1.4. PROFUNDIDAD DE MUESTREO

La evaluación de parámetros biológicos a una profundidad determinada de la masa del suelo, tanto a partir de submuestras tomadas aleatoriamente como de transectas, puede abarcar un

amplio rango de profundidades: desde los 2-3 mm o pocos cm superficiales (Nicolaisen *et al.*, 2004) hasta 30 y 40 cm (Lovaisa *et al.*, 2017; Rodríguez Cerrón y Rivas Yupanqui, 2017) o incluso 100 cm de profundidad (Subbarao y Hubbard, 1999). Para la actividad microbiológica evaluada en la mayoría de los trabajos publicados, la profundidad de muestreo no supera los 30 cm de profundidad, pero, como ya se mencionó previamente, diversos estudios de comunidades y poblaciones microbianas a pequeña y gran escala revelaron sistemáticamente que su distribución es heterogénea y está estructurada espacialmente (Maron, Mougel y Ranjard, 2011).

Es común en estudios de calidad de suelos tomar los primeros 20 cm divididos en dos estratos, 0-10 y 10-20 cm, debido a las diferencias que normalmente se encuentran con relación a la variación de la materia orgánica entre la superficie y la capa que se encuentra debajo, efecto que ha sido llamado estratificación (Gómez y Paolini, 2006; Sánchez de Prager *et al.*, 2006; Durango *et al.*, 2015; Rosero *et al.*, 2019). También se suelen tomar los 30 cm superiores.

Los parámetros microbianos hasta esta profundidad pueden correlacionarse con datos de *stock* de carbono orgánico, cada vez más requeridos por protocolos de estudios ambientales y redes de monitoreo regionales y nacionales en los últimos años. La profundidad de 0-10 cm ha mostrado mayor diferencia para las actividades celulolíticas, actividad biológica global y presencia de fijadores libres de nitrógeno (Martín *et al.*, 2017; Romero *et al.*, 2010).

Cuando se toman muestras de la rizósfera, como es el caso de la evaluación de ectomicorizas, el muestreo se realiza, cuando son árboles, desde el tronco hacia el límite del área que cubre la copa o extrayendo un bloque de suelo en un radio determinado alrededor de la planta, tomando el suelo rizosférico y buscando las raíces laterales a partir de excavaciones a profundidades de 0 a 50 cm, dependiendo de la distribución de las raíces según la especie vegetal (García *et al.*, 2017). En este caso, luego de extraer el monolito con la planta en el centro, y agitar y desprender todo el suelo posible, se toman cuidadosamente pocos gramos de suelo adheridos a las raíces, lo que conforma el suelo rizosférico tomado a la profundidad de la estructura de raíz que cada especie indique.

1.5. MUESTREO SIMPLE Y COMPUESTO

Simple: consiste en tomar una muestra única que representa a un área, lote o situación. Puede ser útil para superficies pequeñas (menores a 5 ha) y uniformes (relieve y topográfica). También es

utilizado para realizar estudios más detallados de suelo (Roberts y Henry, 2000; Prause, 2006; Sosa, 2012). Álvarez *et al.* (2008) y Guachamin Yar (2019) utilizaron este tipo de muestras para evaluar la variabilidad espacial de algunos parámetros edáficos. En este caso, cada muestra es importante para representar patrones de distribución y heterogeneidad presentes.

Compuesto: consiste en tomar varias muestras simples de tamaño uniforme (submuestras) que luego se unen para obtener a través de la operación de cuarteo una única muestra que represente al conjunto. Este muestreo es útil para saber el nivel medio de fertilidad de un lote, pero no es adecuado para evaluar la variabilidad espacial, ya que es el resultado de la mezcla de varias submuestras (Roberts y Henry, 2000; Prause, 2006; Sosa, 2012). Es el tipo de muestra comúnmente utilizada para evaluar índices de calidad y calidad biológica del suelo (Ojeda-Quintana *et al.*, 2018; Serri *et al.*, 2018; Toledo *et al.*, 2013).

La operación llamada *cuarteo* consiste en una reducción representativa del tamaño de la muestra y se realiza de la siguiente manera:

- a. Toma de submuestras.
- b. Mezcla de submuestras sobre una superficie limpia.
- c. División de la porción de suelo en 4 partes según se observa en la Figura N° 2.
- d. Eliminación de una porción de las 4.
- e. Repetición de esta operación tantas veces como sea necesario hasta obtener la muestra compuesta de 0.5 a 1 kg que es la cantidad necesaria a enviar al laboratorio.
- f. Limpieza del material antes de realizar el cuarteo del siguiente conjunto de submuestras.

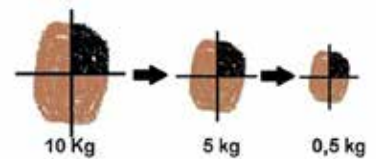


Figura N° 2. Representación gráfica del cuarteo de la muestra (en negro lo que se debe retirar).

1.6. NÚMERO DE SUBMUESTRAS

Uno de los parámetros estadísticos que define la calidad de un análisis es la exactitud del mismo y está definida por la cantidad de submuestras a extraer. Esto nos indica cuán cerca está el valor obtenido respecto del valor verdadero. El número de submuestras a tomar depende de la precisión y exactitud que uno busca obtener en el muestreo (Roberts y Henry, 2000; Conti, 2005; Carretero *et al.*, 2016).

A su vez, también depende de qué tan variable es el parámetro en el suelo y según todo lo expuesto anteriormente, la heterogeneidad de los parámetros biológicos conlleva una necesidad

de mayor cantidad de muestras posibles, lo que significa un costo económico muchas veces difícil de solventar.

Más allá de lo más o menos exactos que sean los resultados de investigaciones microbiológicas, no serían extrapolables a otras regiones edafoclimáticas o fácilmente generalizables (Maron *et al.*, 2011). Si bien la materia orgánica tiene baja variabilidad –al compararlo con el fósforo disponible o el nitrato–, y siendo esta una variable edáfica que se relaciona positivamente con la actividad biológica, es de esperarse que el comportamiento esté correlacionado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la gran dependencia ambiental de los microorganismos, debido a que están estrechamente relacionados con propiedades del suelo como el pH, la textura y los factores como el clima, la humedad del suelo, los regímenes de temperatura del suelo y la vegetación existente e, incluso, los microhábitats que genera la distribución heterogénea de la materia orgánica en macro, meso y microagregados del suelo (Bach *et al.*, 2018).

Su utilidad en la detección de cambios frente a diferentes manejos o situaciones hace que la actividad biológica del suelo sea una determinación importante a incluir dentro de los análisis de suelo tradicionales. Por ello, el número de submuestras se adecúa a las determinaciones físico-químicas, teniendo mayor importancia la estacionalidad, el paisaje (topografía) y vegetación (tipo y estado fenológico del cultivo) al momento de realizar muestreos para la actividad microbiana (Roberts y Henry, 2000; Görres y Amador, 2005; Carretero *et al.*, 2016; Kaleita *et al.*, 2017). Es por esto que, para lograr una muestra compuesta, la bibliografía recomienda un número de submuestras entre 20 y 30 para obtener valores aceptables de precisión (Roberts y Henry, 2000; Carretero *et al.*, 2016).

1.7. METODOLOGÍA DE MUESTREO

Una vez analizada la variabilidad del lote y al evaluarse profundamente el objetivo del muestreo y la cantidad de muestras a sustraer, existen distintas metodologías para hacerlo, relacionadas con la forma en la que se distribuyen las submuestras en la unidad de muestreo, su cantidad y el número de muestras compuestas por lote (Roberts y Henry, 2000; Carretero *et al.*, 2016).

La metodología utilizada puede ser al azar simple o estratificada, con estaciones o zonas de referencia, estaciones estratificadas, gradilla de puntos y/o gradilla de celdas. Dentro de las formas de distribuir espacialmente las submuestras en la unidad de muestreo tenemos gradilla sistematizada, zig-zag y en diagonales, según se

observa en la Figura N° 2 (Roberts y Henry, 2000; Prause, 2006; Sosa, 2012; Carretero *et al.*, 2016).

Aquí solo explicaremos el muestreo al *azar simple* y *estratificado*, que son dos de las formas de encarar esta tarea, más comúnmente difundidas en estudios de fertilidad y de variabilidad de parámetros edáficos (Álvarez *et al.*, 2008; Ojeda-Quintana *et al.*, 2018; Serri *et al.*, 2018; Guachamin Yar, 2019).

El *muestreo al azar simple* consiste en tomar el número de submuestras (puntos rojos en la Figura N° 3) necesarias al azar, en diferentes puntos representativos del lote, que luego se mezclan, homogenizan y cuartean para el envío al laboratorio. Este sistema de muestreo puede utilizarse en situaciones en las que el lote es homogéneo y de superficie inferior a 5 ha, por lo tanto, puede considerarse al mismo como una unidad de muestreo. Si cada muestra obtenida se analiza por separado, se obtendrán entre 20 y 30 muestras simples, pues la cantidad depende de la exactitud buscada (Prause, 2006; Sosa, 2012; Carretero *et al.*, 2016).

El *muestreo al azar estratificado* se caracteriza por individualizar zonas diferentes dentro del lote e identificar cada uno de ellos como unidades de muestreo diferentes (distintos colores en la Figura N° 4), por lo tanto, se obtendrán tantas muestras compuestas como ambientes distintos haya.

Siguiendo el esquema de la Figura N° 3, en el ejemplo de distribución o recorrido en gradillas se observan tres ambientes, por lo que se obtendrán tres muestras compuestas en el lote, mientras que, en las dos formas de distribución restantes, se obtendrán dos muestras compuestas correspondientes a cada ambiente delimitado (Darwich, 2003; Prause, 2006; Sosa, 2012; Carretero *et al.*, 2016).

1.8. CASOS ESPECIALES

En el muestreo de suelo se encuentran los casos especiales de muestreo para lípidos y para actividad microbiana relacionada a especies arbóreas, las que deben realizarse teniendo en cuenta ciertas condiciones.

1.8.1. Muestreo para lípidos

Otra manera de analizar la composición de la comunidad microbiana es a partir del análisis de perfiles de ácidos grasos fosfolípidos. Es una manera eficaz para evaluar tanto la biomasa microbiana como la abundancia relativa de grupos microbianos. Aquí se debe tener en cuenta la manipulación de la muestra, siendo necesaria la utilización de guantes en el muestreo para no contaminar

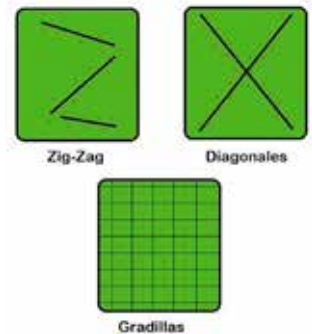


Figura N° 3. Esquema de la distribución espacial de las submuestras en distintos diseños de muestreo.

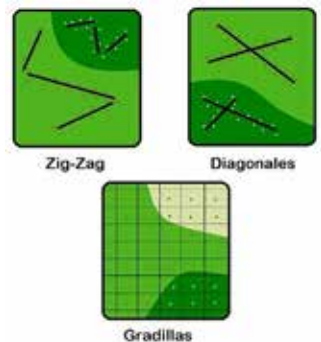


Figura N° 4. Distribución de los puntos en muestreo estratificado: gradilla sistematizada, zig-zag y diagonales.

la muestra, teniendo cuidado además de manipular con guantes todos los elementos a utilizar en el muestreo.

1.8.2. Muestreo para actividad microbiana relacionada a especies arbóreas

En este tipo de muestreo se deben localizar las especies arbóreas más representativas del lugar, como también realizar agrupaciones como, por ejemplo, según el diámetro del tronco, por diámetros mayores y menores según un límite, y al tomar las muestras en la proyección del área de la copa.

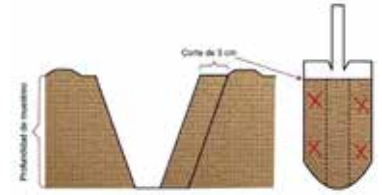


Figura N° 5. Muestras extraídas con pala de punta (porciones laterales eliminadas y marcadas con una «x» roja, Carretero *et al.*, 2016).

1.9. ELEMENTOS Y MATERIALES NECESARIOS PARA EL MUESTREO

El instrumental a utilizar consiste en: pala de punta, cuchillo, escalpelo o bisturí, barrenos, bolsas o frascos estériles, etiquetas y material refrigerante.

Pala de punta. Es un instrumento útil para muestreos no mayores a 30 cm y necesaria para muestreos de suelo rizosférico. Con la pala se obtiene una mayor cantidad de muestra por punto de muestreo, siendo la desventaja el tiempo que se tarda en realizar cada operación. En su uso se recomienda hacer un pozo en «V» y luego retirar de uno de los extremos una porción de 3 cm de espesor (ver Figura N° 5), guardar la parte central y cortar con un cuchillo los extremos y eliminarlos. Si el muestreo es compuesto, las dimensiones a extraer deben ser siempre las mismas para que cada punto de muestreo tenga el mismo peso en la representatividad de la muestra (Prause, 2006; Sosa, 2012; Carretero *et al.*, 2016).

Cuchillo. Es útil para diseccionar la porción de suelo a muestrear cuando el instrumental de muestreo es la pala de punta y ayuda en la limpieza del instrumental. También puede usarse para extraer suelo de un espesor de pocos mm de profundidad, lo que se puede hacer asimismo con una cuchara plana de metal.

Escalpelo o bisturí. Se utiliza para extraer el suelo rizosférico adherido a las raíces.

Barrenos. Estos instrumentos pueden ser adquiridos en empresas agropecuarias o los puede hacer un herrero. Su ventaja es su fácil manejo y uniformidad en el volumen de la muestra recolectada. Para esto último, el barreno debe perforar el suelo de manera vertical y no inclinada, ya que esto afectará la profundidad de suelo explorado y, por lo tanto, el volumen tomado (ver Figura N° 6).



Figura N° 6. Posición correcta del barreno para la toma de muestra.

Según el tipo de suelo, profundidades de muestreo o tipo de cultivo, existen distintas formas de barrenos. En la Figura N° 7 se presentan tres tipos de barreno.

El muestreador de capa arable (ver Figura N° 7A) es utilizado para estudios que no requieren de una profundidad de muestreo mayor a los 20 cm. Estos presentan un recipiente que va almacenando las submuestras a medida que se avanza en la tarea. Para estudios que requieren explorar aún más el perfil del suelo, se utilizan los barrenos tipo tubular (ver Figura N° 7B1), helicoidal (ver Figura N° 7B2) u otros como el Riverside, el espiral y el pedregoso, entre otros, que no se tratan en este capítulo.

Los barrenos tubulares son recomendados para suelos livianos o de baja resistencia mecánica a la penetración. En caso contrario, este implemento requerirá de la ayuda de un mazo (ver Figura N° 7C) o de otro tipo de barreno, como ser el de tipo helicoidal, que es uno de los recomendados para explorar suelos pesados o de una alta resistencia mecánica a la penetración.

Bolsas o frascos estériles. Se deben utilizar bolsas nuevas y limpias, sin contaminantes que alteren las características de la muestra. Es recomendable el uso de doble bolsa con el rótulo entre ambas. También puede utilizarse un marcador indeleble para rotular la bolsa, además de estar acompañada de la etiqueta correspondiente. Algunos autores recomiendan la utilización de frascos para asegurarse que la muestra no se contamine (Ortíz-Maya *et al.*, 2017; Méndez *et al.*, 2020). Solo debe considerarse que la cantidad de muestra que almacenan los frascos podría no ser suficiente.

Etiquetas. La etiqueta es fundamental dentro del proceso de muestreo. Ella debe contar con toda la información necesaria para una correcta identificación y, por lo tanto, sus anotaciones deben ser claras. En la Figura N° 8, a modo de ejemplo, se presenta un modelo de etiqueta con la información necesaria.

La Figura N° 8 presenta un modelo alternativo para la organización de la información que debe incorporarse en las etiquetas. Es importante destacar la conveniencia de escribir con lápiz en el caso de que exista la posibilidad de que las etiquetas sean afectadas por la humedad. Este puede prevenirse con la utilización de doble bolsa y la etiqueta, entre ambas.

Material refrigerante. Dado que los microorganismos, al igual que todos los organismos vivos en general, dependen de los factores climáticos –principalmente de la temperatura y la humedad–, es importante que estos sean controlados, ya que, una vez retirado el suelo del campo, la biomasa microbiana puede cambiar en el



Figura N° 7. Tipos de barrenos. A: para capa arable. B1: tubular. B2: helicoidal. C: mazo o martillo.

Nombre y apellido del solicitante.....		
Dirección.....		Localidad.....
Provincia.....		
Identificación muestra.....		Fecha.....
Profundidad muestreo.....		Observaciones.....
Análisis requeridos.....		

Figura N° 8. Modelo de etiqueta para identificación de la muestra.

almacenamiento (Rivero *et al.*, 1999). Por esto, es importante generar un microclima que suspenda la actividad microbiana, pero sin causar cambios en la dinámica de las poblaciones o la muerte de los microorganismos. Es recomendable para la determinación de la biomasa microbiana, como de otras actividades enzimáticas, que las muestras sean refrigeradas a 4 °C.

En el caso de la biomasa microbiana, es preferible que estas muestras no sean secadas, a diferencia de muestras para actividad biológica global (respiración), donde el análisis se realiza a partir de muestras tamizadas y secas (Kaleita *et al.*, 2017; He *et al.*, 2020).

Para la refrigeración, se recomienda utilizar conservadoras y geles refrigerantes congelados, ya que los mismos son de bajo costo. En el caso de los geles, es importante considerar que con ellos no se corra el riesgo de humedecer las muestras al descongelarse.

1.10. OPERACIÓN DE TOMA DE LA MUESTRA

La primera tarea a realizar es retirar el rastrojo u hojarasca que se encuentre sobre la superficie del punto de muestreo. Una vez realizado lo anterior, utilizar un barreno o pala, según se indicó en el apartado correspondiente a instrumental de muestreo. A medida que se vaya recorriendo el lote, se irán guardando las muestras o submuestras en su bolsa con la etiqueta correspondiente e independientemente del número de submuestras a tomar, es importante que el volumen y profundidad de cada una de ellas sea el mismo.

Si se toma una muestra compuesta, se debe hacer el cuarteo una vez finalizado el recorrido del lote. Guardar las muestras siempre al abrigo del sol y si es necesario, mantener las muestras refrigeradas en una conservadora o instrumental similar adecuado. Es importante limpiar el instrumental de toma de muestra en cada operación para evitar su contaminación debido a las diferentes situaciones de los sitios a muestrear.

Una vez finalizado el muestreo, enviar las muestras de inmediato al laboratorio. En el caso de no ser posible, es recomendable guardar las muestras a temperatura cercana a los 4 °C (Alvear *et al.*, 2007; Durango *et al.*, 2015; Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

En resumen. Es importante tener en cuenta las consideraciones mencionadas ya que, si la muestra no es representativa, los resultados de los análisis del laboratorio no tendrán valor alguno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ, R., Steinbach, H.S., Bauschen, B. y Enjalbert, J.N. (2008). «¿Cuántas submuestras de suelo hay que tomar para caracterizar la fertilidad de un lote en la Pampa Ondulada?» *Información Agronómica*, 37. Disponible en <https://bit.ly/3Js7fuZ>
- ÁLVARO GARCÍA, O. (2015). «Fundamentos para la búsqueda, evaluación y calibración de nuevas metodologías analíticas para suelos en el trópico» [Actas]. *X Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo*. Disponible en <https://bit.ly/33r4k5S>
- ALVEAR, M., Urrea, C., Huaiquilao, R., Astorga, M. y Reyes, F. (2007). «Actividades biológicas y estabilidad de agregados en un suelo del bosque templado chileno bajo dos etapas sucesionales y cambios estacionales». *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición vegetal*, 7(3), 38-50. Disponible en <https://bit.ly/3E2JEoN>
- ARTEAGA GARLBAY, R.I., Gómez Estreada, M.M., Martínez Peña, M.D., Cadenza Zamudio, J.D. y Avendaño Arrazate, C.H. (2016). «Diversidad metabólica funcional de comunidades microbianas asociadas a suelos rizosférico de Maíz (*Zea mays* L.) razas amarillo-zamorano y jala». *Agroproductividad*, 9(8), 87-91.
- BACH, E.M., Williams, R.J., Heargraves, S.K., Yang, F. y Hofmockel, K.S. (2018). «Greatest soil microbial diversity found in micro-habitats». *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 217-226. Disponible en <https://bit.ly/3oOyPL4>
- BAKKER, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wintermans, P.C.A. y Pieterse, C.M.J. (2013). «La rizosfera revisada: microbiómica radicular». *Frontiers in Plants Sciences*, 4, 165. Disponible en [10.3389/fpls.2013.00165](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165)
- BERENDSEN, R.L., Corné, M.J., Pieterse, C.M.J. y Bakker, P.A.H.M. (2012). «The rhizosphere microbiome and plant health». *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486. Disponible en <https://bit.ly/3s29WxK>
- BILYERA, N., Kuzyakova, I., Guber, A., Razavi, A.G. y Kuzyakov, Y. (2020). «How “hot” are hotspots: Statistically localizing the high-activity areas on soil and rhizosphere images». *Rhizosphere*, 16. Disponible en <https://bit.ly/3EVSiiH>
- BÜNEMANN, E.K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R.E., De Deyn, G., De Goede, R., Fleskens, L., Geissend, V., Kuyper, T.W., Mäder, P., Pulleman, M., Sukkel, W., Van Groenigen, J.W. y Brussaard, L. (2018). «Soil quality-A critical review». *Soil Biology and Biochemistry*, 120, 105-125. Disponible en <https://bit.ly/3ELEh7b>
- CAMARGO-RICALDE, S.L. y Esperón-Rodríguez, M. (2005). «Efecto de la heterogeneidad espacial y estacional del suelo sobre la abundancia de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares en el valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, México». *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 339-352. Disponible en <https://bit.ly/3s1DI5F>

- CARNICER, S., Porta, M. y Pérez, G. (2020). «Guía para muestreo de suelos agrícolas». *Boletín Técnico*, 43. Resistencia: Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo.
- CARRETERO, R., Marasas, P.A., Souza, E. y Rocha, A. (2016). «Conceptos de utilidad para lograr un correcto muestreo de suelo». *Archivos Agronómicos*, 15. Canadá: IPNI. Disponible en <https://bit.ly/3pULWdo>
- CHANG, J., Clay, D.E., Carlson, C.G., Clay, S.A., Malo, D., Berg, R., Kleinjan, J. y Wiebold, W. (2003). «Different techniques to identify management zones impact nitrogen and phosphorus sampling variability». *Agronomy Journal*, 95, 1550-1559. DOI: 10.2134/agro2003.1550.
- CHILÓN CAMACHO, E. (2018). «El Paradigma “Suelo Vivo”». *Revista de la Carrera de Ingeniería Agronómica-UMSA. Apthapi*, 4(2), 1148-1172.
- CONTI, M. (2005). «Toma de muestra de suelo». En Marbán, L. y Ratto, S.E. (eds.) *Tecnologías en análisis de suelo: alcance a laboratorios agropecuarios* (pp. 55-63). Buenos Aires: Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.
- DARWICH, N. (2003). «Muestreo de suelos para una fertilización precisa» [Tomo 2]. 2º *Simposio de Fertilidad y Fertilización en Siembra Directa y XI Congreso Nacional de Aapresid*, pp. 281-289.
- DURANGO, W., Uribe, L., Henríquez, C. y Mata, R. (2015). «Respiración, biomasa microbiana y actividad fosfatasa del suelo en dos agroecosistemas y un bosque en Turrialba, Costa Rica». *Agronomía Costarricense*, 39(1), 37-46. Recuperado de <https://bit.ly/31Ngfuq>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] (2006). «Evapotranspiración del cultivo. Guía para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos». *Estudio FAO Riego y Drenaje*, 65.
- FIERER, N., Wood, S.A. y Bueno de Mesquita, C.P. (2021). «How microbes can, and cannot, be used to assess soil health». *Soil Biology and Biochemistry*, 153, 108-111. Disponible en <https://bit.ly/3EQ5Ufp>
- FRIEDRICH, T. (2017). «Manejo sostenible de suelo con Agricultura de Conservación. Significado para el cultivo de arroz». *Revista Ingeniería Agrícola*, 7(1), 3-7. Recuperado de <https://bit.ly/3mlHW4D>
- GARCÍA, S., Pezzani, F. y Rodríguez-Blanco, A. (2017). «Long-term phosphorus fertilization effects on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in Uruguayan grasses». *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4). Disponible en <https://bit.ly/33fGNoe>
- GÓMEZ, M., Kruger, H. y Sagardoy, M. (1996). «Actividad biológica en un suelo de la zona semiárida bonaerense cultivado con la secuencia soja-trigo bajo tres prácticas culturales». *Ciencia del suelo*, 14, 37-41.
- GÓMEZ, Y. y Paolini, J. (2006). «Actividad microbiana en suelos de sabanas de los Llanos Orientales de Venezuela convertidas en pasturas». *Revista de Biología Tropical*, 54(2), 273-285. Recuperado de <https://bit.ly/3s1gaof>

- GUACHAMIN YAR, J. (2019). *Estudio de variabilidad espacial de propiedades químicas del suelo mediante procedimientos geoestadísticos en la comunidad «Larcapamba»*. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Carrera de Ingeniería Agronómica. Quito: UCE.
- HE, H., Liu, Y., Hu, Y., Zhang, M., Wang, G. y Shen, W. (2020). «Soil Microbial Community and Its Interaction with Soil Carbon Dynamics Following a Wetland Drying Process in Mu Us Sandy Land». *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12), 4199. Disponible en <https://bit.ly/3ykD989>
- HENRÍQUEZ, M. y Viloria, J. (1999). «Número de observaciones para obtener semivariogramas de algunas propiedades de suelo y distancias de muestreo». *Agronomía Tropical*, 49(1), 5-17.
- GÖRRES, J.H. y Amador, J.A. (2005). «Spatial patterns». En Hillel, D. et al. (eds.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 562-570). Amsterdam: Elsevier. Disponible en <https://bit.ly/3EMvMsu>
- KALEITA, A.L., Schott, L.R., Hargreaves, S.K. y Hofmockel, K.S. (2017). «Diferencias en la actividad biológica del suelo por tipos de terreno a escala de subcampo en el centro de Iowa, EE.UU.» *PloS One*, 12(7), e0180596. Disponible en <https://bit.ly/3m22c15>
- KUZYAKOV, Y. y Blagodatskaya, E. (2015). «Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept y review». *Soil Biology y Biochemistry*, 83, 184-199. Disponible en <https://bit.ly/3or9qhq>
- LOVAISA, N.C., Guerrero-Molina, M.F., Delaporte-Quintana, P.G., Alderete, M.D., Ragout, A.L., Salazar, S.M. y Pedraza, R.O. (2017). «Strawberry monocropping: Impacts on fruit yield and soil microorganisms». *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4). Disponible en <https://bit.ly/3DQCEnl>
- MARON, P.A. Mougél, C. y Ranjard, L. (2011). «Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest». *Comptes Rendus Biologies*, 334, 403-411. Doi: 10.1016 / j.crv.2010.12.003
- MARTÍN, L.C., Cossoli, M.R., Romero, A.M.E. y Alconada, M. (2017). «Medición de la actividad respiratoria por volumetría para detectar diferencias en un suelo tratado con distintas enmiendas orgánicas». *Agrotecnia*, 25, 63. XI Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología de Suelos-Corrientes.
- MARTÍNEZ CRUZ, A., Carcaño Montiel, M.G. y López Reyes, L. (2002). «Actividad biológica en un transepto altitudinal de suelos de La Malinche, Tlaxcala». *Terra Latinoamericana*, 20(2), 141-146. Chapingo, México: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, AC.
- MÉNDEZ, I., Jaén, Y. y Him, J. (2020). «Calidad microbiológica y físico-química de los suelos aledaños al vertedero de basura de Santiago, Veraguas, Panamá». *Revista Colegiada De Ciencia*, 1(2), 11-21. Recuperado de <https://bit.ly/31KEDgd>

- NICOLAISEN, M.H., Risgardaard-Petersen, N., Revsbech, N.P., Reichardt, W. y Ramsing, N.B. (2004). «Nitrification-denitrification dynamic and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field». *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 359-369.
- OJEDA-QUINTANA, L.J., Machado-Díaz, Y., Bernal-Carrazana, Y., Hernández-Vilches, M.E., Font-Vila, L., Hernández-Rodríguez, C. y Casanovas-Cosío, E. (2018). «Soil quality index in the Animal Husbandry Enterprise El Tablón (Cienfuegos, Cuba)». *Pastos y Forrajes*, 41(1), 13-20. Recuperado de <https://bit.ly/31WXVie>
- ORTÍZ-MAYA, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., Ramírez-Saad, H.C. y Díaz Ramírez, I.J. (2017). «Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos». *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 237-246. Disponible en <https://bit.ly/3EXXPpa>
- OSORIO, N.W. (2012). «Toma de muestras de suelos para evaluar la fertilidad del suelo». *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(1). Disponible en <https://bit.ly/3pUK97M>
- PRAUSE, J. (2006). *Técnicas de muestreo de suelos, aguas y plantas. Bases prácticas para la fertilización*. Corrientes-Resistencia: Librería de la Paz.
- RAAIJMAKERS, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. y Moëgne-Loccoz, Y. (2009). «La rizosfera: un patio de recreo y un campo de batalla para los patógenos del suelo y los microorganismos beneficiosos». *Plant Soil*, 321, 341-361. Doi: 10.1007 / s11104-008-9568-6
- ROBERTS, T.L. y Henry, J.L. (2000). «El muestreo de suelo: los beneficios de un buen trabajo». *Informaciones agronómicas del cono sur. Inpofos*, 42. Disponible en <https://bit.ly/3oRLGfP>
- RODRÍGUEZ CERRÓN, M. y Rivas Yupanqui, F.F. (2017). «Dinámica poblacional de *Azotobacter* spp., en relación al contenido de materia orgánica en una plantación de *E. grandis* Hill - Purumayo, Oxapampa-Pasco». *Ambiente*, 1(1-2), 39-47.
- RIVERO, R., Martín, G. y Pérez, R. (1999). «Efecto de la temperatura sobre la mineralización del nitrógeno de dos especies de abono verde en suelos ferralítico rojo». *Cultivos Tropicales*, 20(20), 15-19.
- ROSETO, J., Vélez, J., Burbano, H. y Ordóñez, H. (2019). «Cuantificación de la respiración y biomasa microbiana en Andisoles del sur de Colombia». *Agro Sur*, 47(3), 15-25. Doi:10.4206/agrosur.2019.v47n3-03
- SÁNCHEZ DE PRAGER, M., Rojas, A., Pérez, J., Zúñiga, O. y Gascó, J.M. (2006). «Actividad y biomasa microbianas como indicadores de materia orgánica en sistemas de cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*)

- en Toro, Valle del Cauca, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia». *Acta Agronómica*, 55(4), 7-12.
- SERRI, D.L., Boccolini, M., Oberto, R., Chavarrí, A.D., Bustos, N., Vettorcello, C., Apezteguía, H., Miranda, J., Álvarez, C., Galarza, C., Chiófaló, S., Manrique, M., Sueldo, R., Fernández Belmonte, M.C., Mattalia, L., Cholaky, C. y Vargas Gil, S. (2018). «Efecto de la agriculturización sobre la calidad biológica del suelo». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 36 (2), 92-104.
- SIQUEIRA, G.M., Vieira, S.R., Souza, Z.M., Dafonte, J. y Paz, A. (2007). «Utilización de herramientas estadísticas y geoestadísticas para optimización del muestreo de propiedades físicas del suelo». En Giráldez Cervera, J.V. y Jiménez Hornero F.J. (eds.) *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*. Vol. 8 (pp. 173-178). Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- SOSA, D.A. (2012). *Manejo de Suelo. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelos*. EEA Cerro Azul. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Disponible en <https://bit.ly/3dLLloE>
- SUBBARAO, K.V. y Hubbard, J.C. (1999). «Evaluation of broccoli residue incorporation into field soil for Verticillium Wilt Control in Cauliflower». *Plant Disease*, 83, 2.
- TOLEDO, D.M., Galantini, J.A., Ferreccio, E., Arzuaga, S., Giménez, L. y Vazquez, S. (2013). «Indicadores e índices de calidad en suelos rojos bajo sistemas naturales y cultivados». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 31(2), 201-212
- TKACZ, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A. y Poole, P.S. (2015). «La estabilidad y sucesión de la microbiota de la rizosfera depende del tipo de planta y la composición del suelo». *ISME J*, 9, 2349-2359. Doi: 10.1038 / ismej.2015.41
- WILSON, M.G. y Sasal, M.C. (2017). *Aplicación de indicadores de calidad de suelo para el monitoreo agroambiental. Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina*. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Capítulo 2. La precisión y exactitud en los análisis de suelo

Sebastián Carnicer y Mario R. Delfino

A pesar de que el concepto de calidad es amplio, en los laboratorios dedicados al análisis de suelos este está relacionado a dos atributos: precisión y exactitud. Estos están asociados a controles internos y externos que se realizan tanto en los procedimientos del laboratorio como en las operaciones de muestreo previas al envío de las muestras.

En el presente capítulo se describen brevemente ciertas consideraciones, criterios y sugerencias que deberían ser tenidos en cuenta al momento de poner en práctica el proceso de estandarización de un método analítico, para no desestimar errores que lleven a una falsa lectura de las situaciones o parámetros evaluados por los distintos métodos propuestos en este compendio de análisis biológicos de suelo (Skoog, West y Holler, 1995; Bullock, 2000; Faithfull, 2005; Vázquez, 2005).

2.1. PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión hace referencia a la reproducibilidad de los resultados al analizar un parámetro por un método determinado, es decir, la concordancia entre los valores obtenidos por las distintas réplicas o repeticiones realizadas de la misma manera. Esta se refiere a la dispersión de los datos obtenidos con las repeticiones y, si dicha dispersión es baja, nos indica que obtuvimos una alta precisión. Por lo tanto, esta es una característica propia del laboratorio y depende de los controles internos realizados en busca de la calidad analítica (Skoog, West y Holler, 1995; Faithfull, 2005; Vázquez, 2005; Russi *et al.*, 2010; Martínez y Osorio, 2018).

Por otro lado, la exactitud indica cuán cercano es el valor obtenido en el ensayo realizado respecto del valor verdadero o aceptado como verdadero. En muchos experimentos, la pregunta más importante a realizarse es: ¿Hasta qué punto se aproxima el resultado al valor verdadero? Esto se expresa como exactitud. La Organización Internacional de Estándares (ISO) define a la exactitud como «el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado». Al no conocerse el valor verdadero o de referencia del parámetro en evaluación, se debe considerar que experimentalmente solo podemos acercarnos a un valor considerado como aceptado o aceptable. Los controles para disminuir el error en la exactitud están dados por controles externos que se verán en un apartado más adelante, pero en líneas generales se refieren a la utilización de patrones y también están relacionados con el muestreo. Si el muestreo no es representativo del problema, el resultado del análisis tendrá una baja exactitud. Debido a esto, la exactitud se expresa en función de errores absolutos y relativos (Salinas y García, 1985; Skoog, West y Holler, 1995; Roberts y Henry, 2000; Faithfull, 2005; Vázquez, 2005; Conti, 2005; Carretero *et al.*, 2016; Martínez y Osorio, 2018).

El error absoluto (E_A) en una medición está dado por la diferencia numérica entre el valor real o aceptado (x_a) y el obtenido por el laboratorio (x_i).

$$E_{Ai} = x_a - x_i$$

Este error puede tener valores positivos o negativos, dependiendo si es mayor o menor que el valor real o aceptado.

Por otro lado, el error relativo (E_r) de cada medición puede definirse como el error absoluto de la misma dividido por el valor considerado como real o aceptado.

$$E_r = E_{ai}/x_a = (x_a - x_i)/x_a$$

El error relativo puede expresarse como porcentaje al multiplicarlo por cien. Es tentador pensar que si uno obtiene una alta precisión esta indique que su exactitud también es alta, pero esto no siempre se da y solo es una de cuatro situaciones posibles de un resultado.

En la Figura N° 1 se representan las posibles combinaciones entre parámetros de alta y baja precisión y exactitud. Estos están representados por puntos que, a medida que se alejan del centro, se alejan del valor real o aceptado (Skoog, West y Holler, 1995; Zamboda Fernández, 2004; Faithfull, 2005; Vázquez, 2005).

Por lo general, lo primero que se busca cuando uno pone a punto un método analítico es aumentar la precisión y luego buscar la exactitud. Como se darán cuenta al mirar la Figura N° 1, una situación que puede darse es obtener una baja exactitud con alta precisión y que ella se confunda con alta exactitud y precisión. Esto sugiere que los análisis están sujetos a, por lo menos, dos tipos de errores. Uno llamado errores aleatorios y otro, sistemáticos. Para evitar tanto esto como los otros resultados posibles, es indispensable, como ya se mencionó, realizar controles internos y externos del proceso analítico (Skoog *et al.*, 1995; Zamboda Fernández, 2004; Faithfull, 2005; Vázquez, 2005).

2.2. ERROR ALEATORIO Y SISTEMÁTICO

El error aleatorio, también llamado indeterminado o accidental, genera dispersión de los datos, ya que estos pueden producirse sin regularidad alguna al obtenerse valores que se diferencian por exceso o defecto del valor considerado como aceptable y, por lo tanto, tener distinto signo. Este tipo de error no se puede eliminar, es propio de cualquier proceso analítico y está presente, por más meticulouso que sea el operador, a la hora de realizar el análisis. Lo que se debe intentar es, entonces, minimizarlo tanto como sea posible.

Como puede verse en la Figura N° 1 A y B, allí la dispersión de datos es alta, por lo tanto también lo será el error; en las imágenes C y D de la misma figura se observan casos opuestos. Es así que puede afirmarse que este tipo de error se asocia al grado de precisión que se tenga en el análisis. Este tipo de error generalmente tiene una distribución normal y, al graficarlo, presenta la forma de una típica *curva gaussiana* o *curva normal de error* (Skoog, West y Holler, 1995; Zamboda Fernández, 2004; Vázquez, 2005; Alonso Felipe, 2016).

El error sistemático o determinado provoca que la media de una serie de datos se aleje del valor real y siempre lleve el mismo signo, pues siempre se produce por defecto o por exceso. En la Figura N° 1 A y C puede verse que este tipo de error es alto debido a que la serie de datos está lejos del centro, ocurriendo lo contrario en las Figuras N° 1 B y D. También aquí se encuentran los errores de tipo instrumental, por ejemplo, la precisión e incertidumbre de la balanza o el empleo de recipientes no aptos cuando se necesitan medir volúmenes con exactitud. Por último, se pueden considerar los errores de operación, estos están ocasionados por el cumplimiento poco escrupuloso o incorrecto de las operaciones analíticas (Skoog *et al.*, 1995; Zamboda Fernández, 2004; Vázquez, 2005; Alonso Felipe, 2016).

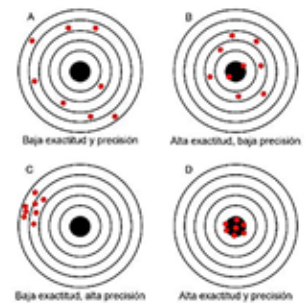


Figura N° 1. Exactitud y precisión.

2.3. CONTROLES INTERNOS Y EXTERNOS

Dicho lo anterior, y en pos de la calidad analítica de los resultados, es imperativo realizar determinados controles en los procesos analíticos. Estos controles pueden ser internos o externos.

Los controles internos están asociados a tareas realizadas con elementos propios del laboratorio y se relacionan más que nada con la precisión de los análisis. Para esto, se pueden realizar repeticiones de análisis, tener muestras de patrones (o de referencia) internas y realizar sobreagregados a las muestras a analizar para estudiar la recuperación.

El hecho de realizar repeticiones del análisis sirve para poder determinar el coeficiente de variación (CV) de nuestro análisis. Este dato puede compararse con la bibliografía de la determinación considerada para así saber si nuestros datos son aceptables o no. Este último depende de la dificultad analítica y del significado agronómico del CV admitido, por lo tanto, si nuestro CV es superior al admitido, debería revisarse la metodología.

Otra herramienta a considerar son las muestras de patrones internas. Esto es útil para análisis físicos y químicos, pero debería tenerse más cuidado a la hora de análisis biológicos, ya que es importante que la muestra destinada para esto no se degrade o altere con el tiempo, lo que podría generar incertidumbres a la hora de evaluar nuestro control o erróneamente provocarnos el descarte de nuestros análisis debido a una alta incertidumbre. Para evitar esto, debe tenerse especial cuidado en el acondicionamiento y almacenamiento de la muestra.

El otro tipo de control que se recomienda para asegurar la calidad de los análisis son los realizados o vinculados a factores externos al laboratorio que reciben el nombre de controles externos. Ellos pueden ser materiales de referencia certificados y análisis de intercontroles voluntarios entre laboratorios.

En el caso de materiales de referencia certificados, la mayoría de los análisis biológicos que se realizan en suelo no cuentan con uno, por lo tanto esto podría solucionarse mediante ensayos interlaboratorios. Con esto se busca disminuir los errores sistemáticos, que son los que provocarían la situación mostrada en la Figura N° 1 B y C en cuanto a la precisión y exactitud (Skoog, West y Holler, 1995; Vázquez, 2005; Russi *et al.*, 2010).

En resumen. Precisión y exactitud, dos conceptos necesarios para obtener valores aceptados como verdaderos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO FELIPE, J.V. (2016). *Prácticas con técnicas instrumentales de análisis físico-químico en laboratorios industriales. ETS Ingenieros Industriales* (Laboratorio QUÍMICA I). Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- BULLOCK, D. (2000). «Análisis de suelos. Algunas ideas acerca de precisión y producción bajo siembra directa» [Conferencia]. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. AACs. Mar del Plata, Argentina.
- CARRETERO, R., Marasas, P.A., Souza, E. y Rocha, A. (2016). «Conceptos de utilidad para lograr un correcto muestreo de suelo». *Archivos Agronómicos*, 15. Canadá: IPNI. Disponible en <https://bit.ly/3pULWdo>
- CONTI, M. (2005). «Toma de muestra de suelo». En Marbán, L. y Ratto, S.E. (eds.) *Tecnologías en análisis de suelo: alcance a laboratorios agropecuarios* (pp. 55-63). Buenos Aires: Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.
- FAITHFULL, N.T. (2005). *Métodos de análisis químico agrícola. Manual práctico* (1a ed.) CAB International. España: Editorial Acribia.
- MARTÍNEZ, M. y Osorio, A. (2018). «Validación de un método para el análisis de color real en agua». *Revista de la Facultad de Ciencias*, 7(1), 143-155. Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v7n1.68086>
- SALINAS, J.G. y García, R. (1985). *Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Programa de Pastos Tropicales.
- ROBERTS, T.L. y Henry, J.L. (2000). «El muestreo de suelo: los beneficios de un buen trabajo». *Informaciones agronómicas del cono sur. Inpofos*, 42. Disponible en <https://bit.ly/3oRLGfP>
- RUSSI, D., Gutiérrez Boem, F.H., Prystupa, P. y Rubio, G. (2010). «Análisis interlaboratorios de sulfatos en suelo. Análisis de precisión» [Actas]. XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- SKOOG, D.A., West, D.M. y Holler, F.J. (1995). *Fundamentos de química analítica* (6a ed.) México: Cengage learning.
- VÁZQUEZ, M.E. (2005). «Controles internos y externos de calidad». En Marbán, L. y Ratto, S.E. (eds.) *Tecnologías en análisis de suelos: alcance a laboratorios agropecuarios* (1a ed.) Buenos Aires: Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.
- ZAMBODA FERNÁNDEZ, H. (2004). *Análisis químico de los alimentos*. La Habana: Editorial Universitaria.

Capítulo 3. Aislamiento, identificación y conservación de rizobios

Andrea A. Sirio y Karina R. Ávalos Llano

La población mundial crece en una escala que pone en riesgo la producción de alimentos. Para lograr una mayor productividad alimentaria, el uso de fertilizantes químicos-sintéticos es una alternativa rápida pero no ecológica debido a su toxicidad al contaminar el ambiente, provocar efectos secundarios en la salud humana y modificar la fertilidad del suelo a largo plazo. Como ecoalternativa, el uso de fertilizantes orgánicos fue creciendo, pero sin alcanzar la efectividad de los fertilizantes químicos. En los últimos tiempos se estableció el uso de microorganismos conocidos como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), que son autóctonos y benéficos, residen en las cercanías de las plantas utilizando metabolitos derivados de ellas, promueven el suministro adecuado de nutrientes a las plantas hospedantes y garantizan su adecuado desarrollo de crecimiento y regulación fisiológica (Van Elsas *et al.*, 2019; Verma, 2019).

La asociación planta-bacteria tiene una gran importancia práctica en la agricultura debido a que la disponibilidad de fuentes nitrogenadas suele ser un factor limitante para el crecimiento de los cultivos. Los rizobios son especies de alfa y betaproteobacterias que pueden crecer libremente en el suelo o pueden infectar leguminosas y establecer una relación simbiótica. La infección de rizobios en las raíces de leguminosas lleva a la formación de nódulos y, en ellos, las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico (N_2), por lo que aquellas leguminosas noduladas pueden crecer bien en suelos no fertilizados, deficientes en nitrógeno.

Hay una marcada especificidad entre las especies de leguminosas y los rizobios con los que establecen simbiosis. Una especie de rizobio particular es capaz de infectar ciertas especies de leguminosas, pero no otras. Un grupo de leguminosas relacionadas que

pueden ser infectadas por una especie particular de rizobios es llamada «grupo de inoculación cruzada».

Se ha visto que inoculando semillas con cultivos puros de rizobios el rendimiento de los cultivos se mejora, debido a que el suelo tiene con frecuencia una deficiencia de estas cepas de bacterias formadoras de nódulos (Park Talaro y Chess, 2012). Si las leguminosas son inoculadas con la cepa de rizobio adecuada, rica en leghemoglobina, fijadora de nitrógeno, desarrollan en sus raíces los nódulos (Madigan *et al.*, 2015; Paul, 2015; Tate, 2021). El proceso de recolección de nódulos, aislamiento e identificación debe obedecer los postulados de Koch (Hungría y Araujo, 1994).

Las bacterias de los nódulos de la raíz de las leguminosas son heterótrofas y capaces de utilizar una amplia variedad de hidratos de carbono. En general, los compuestos inorgánicos de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-) son suficientes para su desarrollo, pero, según las cepas, pueden requerirse aminoácidos y/o vitaminas para obtener resultados óptimos. Los rizobios son aerobios y se desarrollan mejor a 25-30 °C y en un pH de 6-7. Comúnmente, se agregan elementos inorgánicos importantes aún a medios de cultivos complejos (Vincent, 1975).

El aislamiento de los rizobios a partir de nódulos o de microorganismos que puedan encontrarse en el suelo es una etapa muy importante para su posterior estudio. El advenimiento de las técnicas moleculares que permiten su identificación precisa es un gran logro, pero para poder llegar al mismo se debe realizar un correcto aislamiento, siguiendo los pasos adecuados para alcanzar un cultivo puro, factible de analizarse con técnicas moleculares.

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El aislamiento de los rizobios a partir de nódulos o de microorganismos, a través de técnicas moleculares que permiten su identificación precisa y un correcto aislamiento al seguir los pasos adecuados para alcanzar un cultivo puro, es factible de análisis. Los procedimientos aquí detallados son aquellos que pueden ser llevados a cabo en un laboratorio microbiológico de baja complejidad. La prueba en planta como procedimiento de autenticación de los rizobios, además, permite evaluar su capacidad de nodulación.

3.2. OBJETIVOS DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo de la determinación permitirá conocer diferentes técnicas de aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo y/o nódulos de leguminosas, así como obtener cultivos puros, identificarlos con técnicas de microbiología básica y autentificarlos a través de pruebas en plantas. Por último, se podrá conocer cómo conservar los cultivos obtenidos utilizando diferentes técnicas.

3.3. EQUIPAMIENTOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos, materiales y reactivos necesarios para la toma de muestras son las siguientes, desagregadas en pasos.

1. Muestreo de suelo y plantas

- Bolsas plásticas
- Hilo
- Etiqueta
- Fibra permanente/birome
- Pala
- Alcohol 96°
- Encendedor

2. Conservación de nódulos

- Bolsas plásticas
- Colador
- Tubos con tapón o tapa a rosca
- Desecante
- Algodón
- Heladera

3. Acondicionamiento de los nódulos

- Alcohol 96°
- Sodio hipoclorito (50-60 g Cl/L)
- Hidrógeno peróxido (30 volúmenes)
- Agua destilada estéril
- Pinza estéril
- Solución fisiológica estéril
- Varillas de vidrio estéril
- Tips estériles
- Placas de Petri estériles o frascos pequeños
- Mechero o esterilizador de ansa

4. Procesamiento de los nódulos

- Solución fisiológica estéril
- Tips estériles
- Tubos Eppendorf
- Placas de Petri
- Ansa o espátula de Drigalsky
- Mechero o esterilizador de ansa
- Medio de cultivo agarizado

5. Aislamiento de los rizobios

- Placas de Petri
- Medio de cultivo agarizado
- Estufa de incubación
- Ansa
- Mechero o esterilizador de ansas

6. Identificación presuntiva de los rizobios aislados

- Medios de cultivos
- Ansa
- Estufa de incubación
- Kit de coloración (tinción de Gram)
- Portaobjetos
- Solución fisiológica
- Mechero

7. Autenticación del rizobio

- Sustrato estéril (perlita, vermiculita)
- Suelo
- Vasos
- Bandejas
- Agua destilada estéril
- Semillas a testear
- Medio agarizado para plantas
- Pinzas estériles
- Solución de Jensen

8. Conservación del cultivo puro

- Protector (glicerol)
- Medio de cultivo líquido
- Tubos Eppendorf
- Vórtex
- Micropipetas automáticas
- Tips estériles
- Varillas estériles

3.4. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos que se explican aquí deberán seguirse de acuerdo al objetivo del trabajo, no necesariamente siguen una organización lineal. Debe preguntarse cuál es el objetivo que se quiere alcanzar, si se desea utilizar el suelo como inoculante de semillas o utilizarlo en maceta, si se desea aislar los microorganismos desde el suelo o a partir de nódulos de una planta o si se desea autenticar un cultivo a través de una prueba en planta.

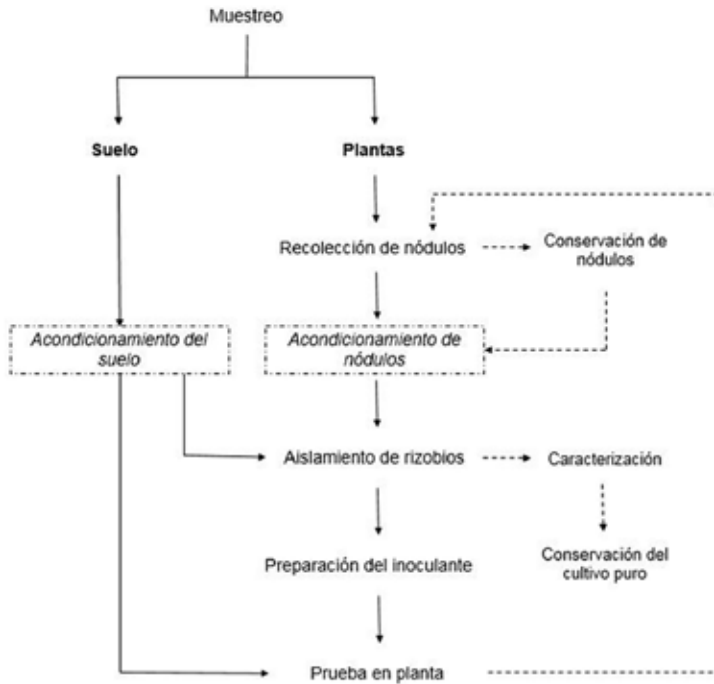


Figura N° 1. Esquema de procedimientos.

3.4.1. Muestreo de suelo

En el capítulo 1 se establecen las condiciones necesarias para obtener una muestra representativa de análisis, por lo que aquí destacaremos algunos puntos clave del mismo, basados en la ISO 10381-6:2009 (Margesin y Schinner, 2005).

Para el estudio de microorganismos en el suelo, se necesitan satisfacer ciertas condiciones: 100 g de suelo mínimo –de acuerdo con su uso, para usar en macetas, para aislar microorganismos desde esa muestra, para realizarse además otros análisis, etcétera–, debe ser homogéneo y representativo del área en estudio, entre otras. La profundidad con frecuencia es de 0-20 cm, donde se concentra la mayor parte del sistema radicular activo y la mayor actividad microbiana.

Se recomienda que los instrumentos de muestreo se desinfecten con alcohol 96° y sean flameados. Este procedimiento se debe repetir cuando se refiera a diferentes profundidades, a diferentes parcelas experimentales y a muestras para ser usadas como inoculantes.

Luego del muestreo, las bolsas plásticas (rotuladas) deben ser cerradas con un hilo (sin cierre total) y colocadas en la sombra. El transporte de las muestras debe ser en un recipiente refrigerado, en el mismo día en lo posible (Yates *et al.*, 2016).



Figura N° 2. Muestra de suelo con raíces de un cultivo de *Vicia sp.*

Si el suelo será utilizado como inoculante, se recomienda que esto ocurra dentro de las 48 h después de muestreado –sin necesidad de refrigerar en ese caso–, de manera de minimizar las alteraciones en la viabilidad de los rizobios. Las muestras se pueden conservar en la heladera hasta 15 días luego de obtenidas, pero el recuento se deberá hacer antes de los 8 días desde la colecta.

Se recomienda, además, tamizar en una malla no menor a 4 mm. Se deben tener los mismos cuidados con respecto a la contaminación, como los considerados en los instrumentos utilizados en la toma de muestra. El valor de la humedad, de 105-110 °C, será necesaria para relacionarla con el recuento de rizobios en el suelo.

En este caso, se pueden sembrar las semillas de la leguminosa (estériles) en cuestión en el suelo muestreado o se inoculan muestras de suelo en suspensión con agua estéril en macetas o tubos con soporte inerte, así se espera la aparición de los nódulos en el tiempo correspondiente y se procede como se explica a continuación en el apartado de recolección de nódulos (Hungria y Araujo, 1994).

3.4.2. Recolección de nódulos

Los nódulos de las raíces de las leguminosas varían en su forma (esféricos, alargados o ramificados) y en su tamaño (de 0,5 a 50 mm de diámetro), pero siempre se destacan fácilmente de las raíces. El color interno de un nódulo vivo y activo varía de rojo claro a oscuro y su consistencia es firme y, al abrirlo, sus tejidos liberan una savia de color rojo. Los nódulos muertos tienen consistencia esponjosa y coloración interna oscura o negra. Los nódulos vivos que tienen una coloración interna verde o blanca son inactivos. Los nódulos de coloración roja/rosada no siempre son activos, pero tienen mayor probabilidad de serlo (Centro Internacional de Agricultura Tropical [Ciat], 1988; Drew *et al.*, 2012).

En la parcela experimental. Una vez identificada y seleccionada la planta, se debe demarcar un círculo alrededor de la misma (correspondiente al sistema radicular). En el caso de leguminosas herbáceas, un círculo de 15 cm (aproximadamente) es suficiente, pero en el caso de arbóreas, pueden ser necesarios dos círculos (uno cercano a la raíz principal y otro más distante, para las raíces secundarias). Para las leguminosas herbáceas, cavar a una profundidad de unos 30 cm. En el caso de arbóreas, se pueden encontrar nódulos a mayor profundidad. El suelo debe removerse con cuidado para no dañar el sistema radicular, nunca debe halarse la planta porque dañaría los nódulos. Colocar la planta o las raíces en una bolsa plástica, siguiendo las mismas indicaciones que para la muestra de suelo (Ciat, 1988; Hungria y Araujo, 1994).



Figura N° 3. Muestra de raíces de cultivo de *Vicia sp.*

En el laboratorio (prueba en planta). Se «desarma» el ensayo, con cuidado de no perder nódulos ni dañar el sistema radicular. Revisar nódulos en la raíz principal y raíces secundarias.

3.4.3. Conservación de nódulos

Para obtener una buena muestra de nódulos, se seleccionan de 10 a 20 nódulos vivos e intactos de la misma planta y se colocan completos, adheridos a la raíz, lo que facilita su manejo.

La localización de los nódulos en el sistema radical depende de la especie hospedante y de las condiciones ambientales. En ciertas condiciones, los nódulos se hallan muy alejados de la corona; algunos se encuentran a considerable profundidad, mientras que otros se localizan, en su mayor parte, en las raíces laterales. Sin embargo, en la mayoría de las leguminosas de uso agronómico, los nódulos se encuentran cerca de la raíz principal y se los puede obtener fácilmente.

Cuando el material (raíces y/o nódulos) se obtuvo recientemente, lavarlo cuidadosamente, en lo posible sobre un colador, para evitar la pérdida de nódulos pequeños. Los nódulos frescos pueden ser guardados hasta 2 días en la heladera, no en el freezer (Somasegaran y Hoben, 1994).

Si los nódulos recolectados no se van a analizar inmediatamente, pueden colocarse en un tubo (con tapa/tapón) con material desecante en el fondo (cloruro de calcio anhidro o silica gel). El material desecante es cubierto con algodón y sobre él se depositan los nódulos. El desecante permite remover la humedad de los nódulos rápidamente, de manera de evitar el crecimiento de otros microorganismos. Se recomienda que no pasen más de 12 meses (Ciat, 1988).

Para reacondicionarlos deben ser rehidratados. Si estuvieron por un corto período de tiempo desecados, hidratarlos en un frasco con agua por 1 o 2 h a temperatura ambiente es suficiente; si el tiempo fue mayor, hidratarlos en un frasco con agua por la noche, dejando el frasco en la heladera (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994).

3.4.4. Acondicionamiento de los nódulos

Para el procesamiento de los nódulos, se pueden utilizar placas de Petri estériles, tubos de poca profundidad o frascos pequeños que permitan introducir las pinzas estériles si fuera necesario. Luego, seleccionar los nódulos que se utilizarán para el aislamiento posterior de microorganismos, puesto que se los puede separar por raíz principal/secundaria o hacer un *pool* de nódulos.

Hay varias combinaciones factibles de usar para lograr el acondicionamiento de los nódulos. En este procedimiento se utiliza



Figura N° 4. Muestra de raíces de cultivo de Caupí.



Figura N° 5. Muestra de raíces de cultivo de *Glycine max* L.



Figura N° 6. Fotografía de nódulos de *Prosopis* sp. visualizados en una lupa binocular (aumento 50x).

una combinación de alcohol 96°, hipoclorito de sodio y agua estéril (Somasegaran y Hoben, 1994):

1. Sumergir los nódulos en alcohol 96° por 15 o 30 segundos y eliminar la raíz para evitar el aislamiento de endófitos. La función del alcohol no es desinfectar, sino romper la tensión superficial y remover burbujas de aire del tejido.
2. Enjuagar con agua destilada estéril 5 veces.
3. Agregar una solución de 3 o 5% de hipoclorito de sodio, debe ser la lavandina tradicional con una concentración de 50-60 g Cl.L⁻¹, dejarlos 5 minutos. También se puede utilizar agua oxigenada al 3% (30 volúmenes).
4. Lavar con abundante agua destilada estéril, por lo menos 5 veces. Siempre realizarlo de manera aséptica. Se puede hacer uso de pinzas estériles, trabajando cerca del mechero o en una cabina de seguridad biológica. Las pinzas deberán flamearse entre cada paso.

3.4.5. Procesamiento de los nódulos

Los nódulos acondicionados pueden introducirse en tubos Eppendorf (estériles) –o mayores– con unos microlitros de solución fisiológica estéril o agua destilada estéril. Con ayuda de varillas de vidrio estériles, palillos de madera estériles o tips de micropipeta estériles machacar los nódulos. El macerado de los nódulos con la solución tendrá un aspecto lechoso oscuro.

3.4.6. Aislamiento de los rizobios

Hay muchos medios disponibles para el crecimiento de rizobios, la selección del mismo puede hacerse según el objetivo del trabajo y a qué reactivos se tiene acceso.

Los medios más utilizados por sus ingredientes accesibles son el medio TY (Tripton extracto de levadura) y el medio EMA (Extracto de levadura manitol agar) o YMA (Yeast Mannitol Agar). Según la bibliografía consultada, la composición puede variar en algunos ingredientes (Vincent, 1975; Brenner, Krieg y Staley, 2005; Atlas, 2010; Albanesi *et al.*, 2013).

Con una composición semejante al medio extracto de levadura manitol agar, se encuentra el Medio Rhizobium 1 (Atlas, 2010), que es útil para el cultivo de miembros de *Rhizobiaceae*. Para preparar una solución de 1000 ml, lleva las mismas cantidades de todos los reactivos, excepto que no contiene ni manitol ni Rojo Congo y se le agregan 0,002 g de hierro cloruro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O), ajustando el pH a 7,2 ± 0,2 a 25 °C.

Tabla N° 1. Medio extracto de levadura manitol agar

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
Fosfato dipotásico (K_2PO_4H)	0,5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,4 g
Agar	15 g
Solución acuosa de Rojo Congo	10 ml

Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ a 25 °C. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Deben evitarse los calentamientos repetidos, por lo que se recomienda preparar la cantidad de medio necesaria. Como guía: para una placa de Petri de 90 mm de diámetro, se agregan 15 ml aproximadamente.

Observaciones: 1. Agregar 4 g de $CaCO_3$ en exceso a medios para mantener el cepario y aquellos donde la neutralización de la acidez puede ser importante (Yeast Mannitol Agar modified); 2. Solución de Rojo Congo: 0,5 g en 200 ml de agua destilada; 3. Para la preparación del medio YMA líquido, se agregan los mismos ingredientes, excepto el agar y el Rojo Congo; 4. Si desea demostrar una variación del pH en el medio, se agregan 5 ml de una solución alcohólica de Azul de bromotimol al 0,5% por litro.

Fuente: Atlas (2010) y Vincent (1975).

Tabla N° 2. Medio TY

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de calcio 2-hidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,9 g
Triptona	5 g
Agar	15 g

Fuente: Atlas (2010).

Para la siembra del macerado, se deben tomar unos microlitros con ayuda de una micropipeta (con tips estériles), sembrar en las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo correspondiente (medio YMA, medio TY, etc.) y estriar con la ayuda de un ansa estéril o ayudarse con una espátula de Drigalsky estéril para sembrar toda la superficie de la placa de Petri (Ciat, 1988). Puede tomarse una ansada directamente de la solución y sembrarse de igual manera. Es recomendable sembrar 2 a 3 placas.

La temperatura adecuada para su crecimiento es de 25 a 30 °C. El crecimiento se debe verificar diariamente. Los rizobios de crecimiento rápido suelen crecer entre los 3 y 5 días, mientras que los de crecimiento lento suelen tardar entre 7 y 10 en crecer (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005).

Puede ocurrir que, si los nódulos estuvieron mucho tiempo desecados o el repique provenga de un cultivo «viejo», el crecimiento sea más lento que lo normal.

Para el aislamiento de rizobios desde el suelo, se recomienda sembrar semillas esterilizadas superficialmente y observar luego la formación de nódulos en las plantas emergentes. Otra opción es agregar suspensiones de las muestras de suelo a plántulas provenientes de semillas esterilizadas superficialmente, en condiciones bacteriológicamente controladas. Solo en casos excepcionales habrá rizobios en cantidad suficiente para aislarlos con cierta confianza (Vincent, 1975; Organización de las Naciones Unidas [FAO], 1995).

3.4.7. Identificación presuntiva de los rizobios aislados

Para facilitar su identificación, el medio de cultivo suele contener Rojo Congo o Azul de bromotimol en su composición. El Rojo Congo permite identificar posibles contaminantes presentes, ya que estos absorben el color rojo, mientras que los rizobios no lo absorben o lo hacen muy poco, especialmente si son repiques recientes. Cultivos «viejos» o algunos cultivos pertenecientes a algunos rizobios tropicales de crecimiento lento, sin embargo, pueden llegar a absorberlo (Vincent, 1975; Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005). El Azul de bromotimol a pH 6,8 deja el medio de un color verdoso y sirve para mostrar variación en el pH del medio: si las bacterias acidifican el medio, este se vuelve de color amarillo; si las bacterias lo alcalinizan, se volverá de color azul (Vincent, 1975).

Se deben preparar frotis una vez aisladas las colonias de cultivos puros. Con la tinción de Gram deberán observarse bacilos gram negativos y, según el género, estos bacilos podrán ser mayores o menores hasta asemejarse a formas cocobacilares.

3.4.7.1. Tiempo de crecimiento y producción de ácidos/álcalis
El género *Rhizobium* (por ejemplo, *R. leguminosarum* *bv.* *phaseoli*) tiene crecimiento rápido, con un tiempo de generación de 1,5 a 5,0 h, mientras que el género *Bradyrhizobium* (por ejemplo, *B. japonicum*) tiene crecimiento lento, con un tiempo de generación de 9,0 a 18 h (Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005; Frioni, 2011).



Figura N° 7. Esquema del macerado de nódulos extraídos en un tubo Eppendorf y siembra en una placa de Petri.

En medios de sales minerales con manitol u otros carbohidratos, el género *Rhizobium* produce una reacción ácida, mientras que el género *Bradyrhizobium* produce una reacción alcalina en esas condiciones.

3.4.7.2. Morfología colonial

El género *Rhizobium* forma colonias usualmente blancas o beige, circulares, convexas y semitranslúcidas u opacas, elevadas y mucilaginosas, usualmente de 2 a 4 mm de diámetro, a los 3 o 5 días de incubación en medio YMA agar. El crecimiento en medios con presencia de carbohidratos usualmente viene acompañado de una abundante cantidad de polisacárido extracelular. En medios líquidos aireados, desarrolla una pronunciada turbidez luego de 2 o 3 días de incubación.

Las colonias características del género *Bradyrhizobium* son circulares, opacas, raramente translúcidas, blanquecinas, convexas y suelen presentar una textura granular, sin exceder el mm de diámetro, apareciendo en no menos de 5 o 6 días. En medios líquidos aireados se desarrolla luego de 3 o 4 días de incubación (Hungría y Araujo, 1994; Brenner, Krieg y Staley, 2005).

Debido a esta diferencia en los tiempos de crecimiento, es que se deben controlar a diario las placas de Petri. Las colonias de rizobios de crecimiento rápido pueden llegar a enmascarar aquellas colonias de crecimiento lento que, además, son más pequeñas en tamaño. Esperar el tiempo recomendado antes de descartar las placas, ya que si el aislamiento contiene solo colonias de crecimiento lento, estas tardan en poder visualizarse y tienen un tamaño que no suele exceder el milímetro de diámetro.

3.4.7.3. Tinción diferencial

La tinción de Gram es uno de los pasos iniciales para iniciar la identificación de los rizobios y es un método simple que permite distinguir dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas. Esta técnica detecta diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias, visualizándose en el frotis como coloración violeta (grampositivas) y rosa (gramnegativas), de acuerdo con Hungría y Araujo (1994), Cappuccino y Welsh (2018), Gamazo, Sánchez y Camacho (2013).

Utilizar portaobjetos limpios y secos para la tinción. Siguiendo los pasos a continuación:



Figura N° 8. Medio con Azul de bromotimol, reacción ácida en tubos y en placas de Petri.

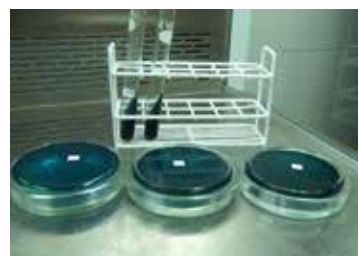


Figura N° 9. Medio con Azul de bromotimol, reacción alcalina en tubos y en placas de Petri.



Figura N° 10. Medio con Azul de bromotimol, reacción ácida. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.

1. Colocar una gota de solución fisiológica estéril o agua estéril y una ansada del cultivo o muestra a evaluar.
2. Homogeneizar y extenderlo a lo largo del portaobjetos, de manera que no quede una película gruesa. Dejar secar al aire.
3. Pasar durante unos segundos el frotis sobre la llama de un mechero, de 4 a 5 veces, para fijar la muestra. Dejar enfriar.
4. Colocar cristal violeta cubriendo la muestra y dejar 1 minuto. Enjuagar con agua corriente.
5. Colocar Lugol y dejar 1 minuto. Enjuagar con agua corriente.
6. El próximo paso es importante hacerlo de manera rápida para evitar que se lave el preparado. Colocar unas gotas de decolorante alcohol-acetona o alcohol 96° durante 5 segundos y enjuagar rápidamente con agua corriente.
7. Cubrir la muestra con safranina y dejar 45 segundos. Enjuagar con agua corriente y dejar secar.

Al observar al microscopio, se debe comenzar con la platina alta, con el menor aumento (10x) e ir bajando la platina (con el tornillo macrométrico) hasta enfocar la muestra con ayuda del tornillo micrométrico. Luego, pasar al aumento 40x, para posteriormente agregar aceite de inmersión para pasar al aumento 100x y anotar las características del preparado, después de recorrer varios campos.

Recuerde que una vez que alcanzó el mayor aumento, es necesario el uso del aceite de inmersión. Cuando se encuentra en los aumentos 10x y 40x, puede pasar de uno al otro sin problema, pero cuando llega al aumento 100x, como se agrega el aceite de inmersión, no se puede volver a los aumentos 10x ni 40x. Tenga presente que las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son bacilos gramnegativos de 0,5-0,9 μm x 1,2-3,0 μm (Brenner, Krieg y Staley, 2005).

3.4.8. Conservación del cultivo puro

Según Vincent (1975), si bien la multiplicación y en consecuencia el riesgo de variaciones puede atenuarse mediante la conservación a bajas temperaturas, los cultivos en agar suelen ser propensos a ser genéticamente inestables. Es común observar dos o más formas en cultivos que se mantuvieron de esa forma –a veces en pocos meses– y también puede perderse muy rápidamente la capacidad simbiótica (virulencia o efectividad).

3.4.8.1. Tubos-agar inclinado

Estos cultivos son los más convenientes por su simplicidad, puesto que no presentan dificultades para la conservación de muchas

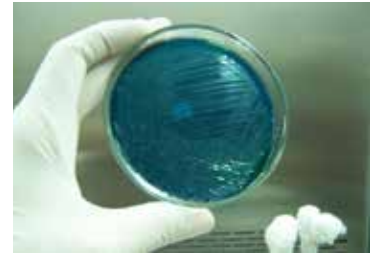


Figura N° 11. Medio con Azul de bromotimol, reacción alcalina. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.



Figura N° 12. Medio YMA. Vista superficial del aislamiento en una placa de Petri.



Figura N° 13. Medio YMA. Fotografía de las colonias aisladas en superficie, visualizadas en una lupa binocular (aumento 50x).

cepas, no ocupan mucho espacio y utilizan poco medio de cultivo. A 15 °C pueden mantenerse durante 6 meses y a bajas temperaturas (2 °C), pueden conservarse hasta 2 años en condiciones aceptables. La desecación constituye la amenaza más seria contra la viabilidad, pero puede reducirse su efecto utilizando tubos con tapa a rosca o tubos de ensayo con una capa aislante de parafina líquida estéril. Los tubos con tapón de algodón pueden sufrir más problemas relacionados a la condensación de la humedad y al desarrollo de mohos.

3.4.8.2. Placas de Petri

Esta forma de conservación se suele ocupar cuando los cultivos serán utilizados en un corto período de tiempo. De la misma manera que con los tubos de agar inclinado, los problemas de este tipo de conservación están relacionados a la condensación de la humedad, a la desecación del medio de cultivo y al desarrollo de mohos, en tiempos mayores a los aconsejados.

3.4.8.3. Criopreservación

El empleo de bajas temperaturas para mantener células es conocido hace tiempo y su fundamento es la inhibición de la actividad metabólica celular. La supervivencia de las células conservadas por este método depende de las condiciones empleadas: temperatura, protectores usados, método de congelación/descongelación posterior, entre otros.

El protector más utilizado es el glicerol en distintas concentraciones (de 20 a 50% de glicerol) y en distintas relaciones con respecto al medio líquido que contiene el microorganismo a conservar (50:50, 30:70 glicerol/medio líquido). Hay varios medios líquidos que se pueden utilizar, siendo el medio YMA líquido o el medio TY líquido los más utilizados. El microorganismo a conservar debe encontrarse en la fase logarítmica de la curva de crecimiento microbiano.

Para la conservación de los microorganismos, se debe agregar en tubos Eppendorf estériles hasta 1 ml de la mezcla del medio líquido y protector (por ejemplo, 700 µl de medio líquido con el microorganismo a conservar y 300 µl del glicerol). Otra forma es agregar el medio líquido (sin el microorganismo) y el glicerol y, con ayuda de una varilla estéril, tomar varias colonias de una placa de Petri con el aislamiento a conservar. En este último caso, se debe recordar que el aislamiento debe ser homogéneo, cuando se ha verificado que no hay contaminación y que las colonias provienen de un mismo clon (Ciat, 1988; Hungría y Araujo, 1994).

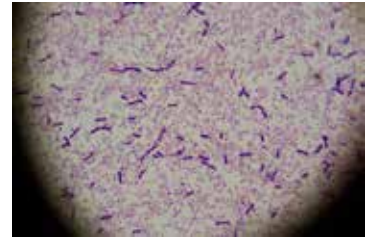


Figura N° 14. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos grampositivos contaminando el preparado de bacilos gramnegativos (aumento 1000x).



Figura N° 15. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos finos alargados, gramnegativos (aumento 1000x).

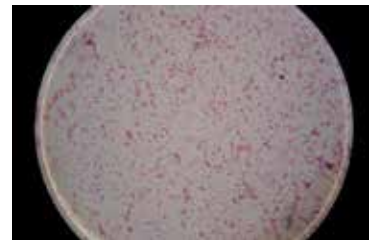


Figura N° 16. Frotis-tinción Gram. Se observan bacilos cortos, gramnegativos (aumento 1000x).

3.4.9. Preparación del inoculante

La inoculación es la práctica que implica aplicar microorganismos a los sistemas agrícolas o químicos para producir transformaciones deseables como la fijación mejorada de nitrógeno, la adquisición aumentada del fósforo, una degradación más rápida o una mayor resistencia a las enfermedades. Existen tres factores que garantizan una eficaz inoculación: el inóculo debe ser viable, debe haber suficiente inóculo para producir el cambio deseado y debe garantizarse la capacidad de los microorganismos contenidos en el inóculo para multiplicarse y sobrevivir. En ensayos a campo, las poblaciones extrañas –incluyendo el inóculo– suelen descender debido al antagonismo con las poblaciones nativas (Coyne, 2000).

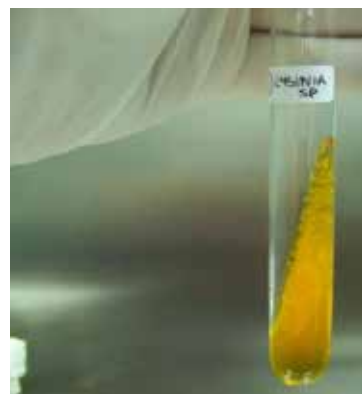


Figura N° 17. Tubo inclinado con medio con Azul de bromotimol, mostrando una reacción ácida.

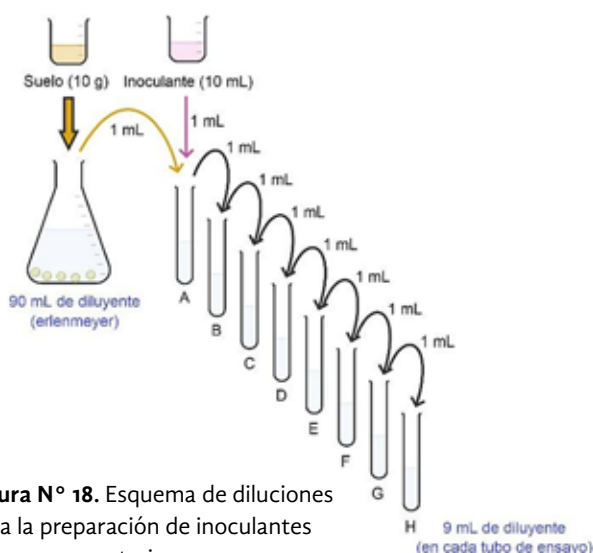


Figura N° 18. Esquema de diluciones para la preparación de inoculantes en ensayos posteriores.

Las diluciones se preparan según el esquema de la Figura N° 16, pudiendo ser la muestra inicial sólida o líquida. En el caso de muestras líquidas, la primera dilución (10^{-1}) será aquella donde se tenga 1 ml de muestra en 9 ml del diluyente, en un tubo de ensayo. Las diluciones serían: tubo A, corresponde a una dilución $1:10$ (10^{-1}); tubo B, corresponde una dilución $1:100$ (10^{-2}); tubo C, (10^{-3}); tubo D, (10^{-4}), y así sucesivamente. En el caso de muestras sólidas, la primera dilución (10^{-1}) será aquella donde se tengan 10 g de muestra en 90 ml del diluyente, en un Erlenmeyer, y las siguientes diluciones se realizan en tubos de ensayo. En este caso, el tubo A tendrá una dilución $1:100$ (10^{-2}), ya que previamente la muestra se diluyó en el Erlenmeyer; el tubo B, corresponde a una dilución $1:1000$ (10^{-3}), y así sucesivamente.

El número de tubos a utilizar (diluciones) variará según el material a evaluar (densidad de rizobios), por lo que se recomienda para inoculantes comerciales, 10 tubos; para suelos con una densidad elevada, 7-8 tubos, y para suelos con baja densidad, 4-5 tubos.

Al Erlenmeyer se le pueden agregar perlas de vidrio estériles –o un dispersante– para facilitar la dispersión de los rizobios. La solución diluyente puede ser una solución fisiológica estéril o agua destilada estéril, entre otras. Los tips a utilizar en el procedimiento deben ser estériles. En lo posible, se recomienda no tardar más de 60 minutos en la preparación de las diluciones para mantener la viabilidad de las células.

La solución en el Erlenmeyer se debe agitar por 30 minutos a 170-200 ciclos por segundo. Luego se inicia el agregado de 1 ml de la solución (del Erlenmeyer) al primer tubo. Se agita en vórtex. Posteriormente, se toma una alícuota de 1 ml de este tubo y se lleva al siguiente. Se repite esta operación hasta completar la serie de tubos recomendados o las deseadas por el operador (Hungria y Araujo, 1994; Yates *et al.*, 2016).

Se puede verificar el recuento de microorganismos, si se desconoce el número aproximado, sembrando una alícuota de cada dilución en placas de Petri, con algunos de los medios de cultivo anteriormente citados para rizobios, de manera de saber qué concentración de rizobios posee la muestra (suelo, inoculante). El resultado final se expresa en Unidad Formadora de Colonia (UFC) por g de suelo seco o ml de inoculante analizado, sin olvidar la dilución en el cálculo (Tate, 2021). Este resultado nos dará un recuento de células viables. Se puede medir la densidad óptica (método turbidimétrico) utilizando un nefelómetro o un espectrofotómetro; si utilizo esta metodología, obtendré el valor de células totales –viables y no– utilizando una longitud de onda de 625 nm. En esa metodología se utilizan diluciones de una mezcla de Bario cloruro 1,175% con ácido sulfúrico 1% para la obtención de la curva patrón (Tortora, Funke y Case, 2019).

La inoculación se realiza al estar la plántula establecida, 1 o 2 días de la siembra aproximadamente. Se debe transferir la alícuota de la dilución deseada a los vasitos con las plántulas. Se recomienda que el número de repeticiones por dilución no sea inferior a 3. Transferir una alícuota de la dilución a ensayar en la región radicular, recomendándose 0,1 ml para semillas pequeñas y 1 ml para semillas grandes (Hungria y Araujo, 1994).

3.4.10. Autenticación del rizobio: prueba en planta

Para comprobar que el aislamiento es capaz de formar nódulos en la leguminosa, el cultivo puro debe inocularse nuevamente en el hospedero.

Este paso puede verse afectado en el caso de ciertas plantas de las que no se disponen semillas o cuyo ciclo de crecimiento es muy largo. En esos casos a veces son utilizadas otras especies forestales para testear su capacidad de nodulación, ya que muchas de ellas son de nodulación promiscua.

Un indicador de eficiencia de tales bacterias viene dado por el color rojizo (interno) de los nódulos, debido a la presencia de leghemoglobina. Esta coloración se hace evidente en los estadios tempranos de la fijación del nitrógeno, acentuándose en la época del florecimiento (Hungría y Araujo, 1994).

No se debe incorporar a una colección como *Rhizobium* un nuevo aislamiento antes de ser autenticado, de igual manera se debe actuar al usar un cultivo que ha estado conservado por un largo tiempo (Vincent, 1975).

Las condiciones de crecimiento de las plantas son importantes para el buen desarrollo del ensayo. La siembra se realiza en vasos a capacidad de campo, por lo que se debe evitar el riego hasta la emergencia, para evitar que se pudra la semilla. A las bandejas de plantas inoculadas agregar, por bandeja, un testigo positivo y uno negativo.

Hay varios procedimientos disponibles para la desinfección de las semillas. Lo importante es retirar superficialmente la mayoría de los microorganismos—incluso rizobios—sin disminuir o afectar su poder germinativo (Hungría y Araujo, 1994). La semilla de la especie a probar debe ser una semilla nueva, cosechada en el ciclo agrícola del año de empleo, sin ningún tipo de tratamiento, ser de tamaño uniforme y tener el máximo de poder germinativo.

Fuente de luz. Pueden utilizarse lámparas de sodio de 400 W o lámparas led adecuadas.

Altura. Un m al borde de los vasos.

Luminosidad. Más de 8000 lux desde la fuente hasta las plantas.

Fotoperíodo. Por 16/8 (soja, poroto, maní, caupí), 14/10 (alfalfa, arveja, garbanzo y tréboles), en otras especies se debe utilizar el fotoperíodo teórico correspondiente.

Temperaturas. Máxima de 30 °C (para especies primavero-estival, tipo soja) y 25 °C (para especies otoño-invernal, tipo alfalfa); mínima diurna de 25 °C (tipo soja) y 20 °C (tipo alfalfa); mínima nocturna de 20 °C (tipo soja) y 15-20 °C (tipo alfalfa).

Humedad relativa. Mínima del 65%.

Riego. Con agua destilada (pH 7, no menor a 6), en caso de necesidad, antes de la emergencia, hasta 10 ml por maceta, manteniendo una base de 1 cm con agua destilada y el estrato superior del sustrato húmedo. Plantas con más de 15 días de crecimiento, regar

1 vez a la semana con solución de Jensen diluida 1:4 (Albanesi *et al.*, 2013).

Tabla N° 3. Solución de reserva micronutrientes-stock

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 mL
H ₃ BO ₃	0,31 g
Na ₂ MoO ₄	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g
KI	0,041 g
CaCl ₂	0,001 g

Fuente: Albanesi *et al.* (2013) y Ciat (1988).

Tabla N° 4. Solución de Jensen

Reactivos	
Agua destilada	hasta 1000 ml
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Solución stock	5 ml

Fuente: Albanesi *et al.* (2013) y Ciat (1988).

3.4.10.1. Prueba en planta en sustrato estéril

Los sustratos utilizados para crecimiento de plantas deben tener ciertas características: presentar granulometría uniforme, estabilidad química y no poseer elementos fitotóxicos, estabilidad luego de la esterilización, aireación adecuada, bajo costo, buena retención de humedad y adecuada capacidad de tampón. Los más utilizados son la vermiculita y la perlita, pero también se puede utilizar arena gruesa, tierra y turba estéril.

La vermiculita es de reacción neutra, con buenas propiedades de amortiguamiento químico e insoluble en agua, mientras que la perlita no tiene capacidad de amortiguamiento químico ni de intercambio químico y no contiene nutrientes minerales. Se puede utilizar una mezcla de ambos sustratos para las pruebas en planta.

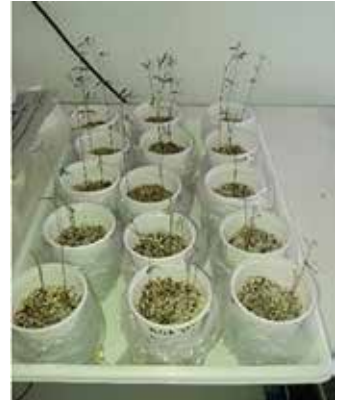


Figura N° 18. Prueba en planta (*Vicia sp.*), utilizando un sustrato compuesto por perlita y vermiculita.

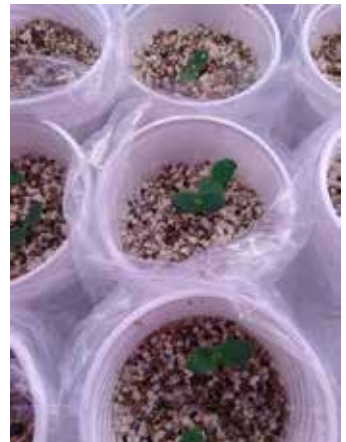


Figura N° 20. Prueba en planta (Caupi), utilizando un sustrato compuesto por perlita y vermiculita.

Para su preparación, primero la vermiculita, tamizarla para eliminar el polvo y esterilizarla en autoclave (121 °C por 20 o 60 minutos); segundo la perlita, es un producto estéril, pero se puede esterilizar en estufa (Albanesi *et al.*, 2013).

3.4.10.2. Prueba en planta en medio de Jensen

Para el medio agarizado semisólido, se agrega a la solución de Jensen (Tabla N° 4) y 8 o 10 g de agar.L⁻¹ de medio.

Al preparar los tubos para la prueba en planta, se agrega un cuarto de volumen cubierto con este medio nutritivo agarizado. Se colocan tapones de algodón para permitir la difusión del oxígeno. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e inclinar levemente (Albanesi *et al.*, 2013).

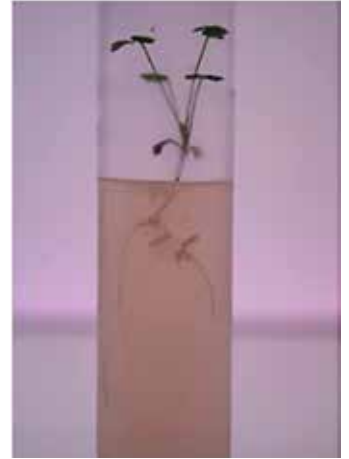


Figura N° 21. Prueba en planta (alfalfa), utilizando medio de Jensen.

En resumen. El aislamiento de rizobios a partir de nódulos o microorganismos debe ser preciso y correcto como etapa fundamental para su posterior estudio con técnicas moleculares. Como en todo análisis, la toma de muestra es una etapa fundamental para lograr el éxito del mismo. Para lograr la autenticación del rizobio, se deben cumplir los postulados de Koch. Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la identificación de estos microorganismos se ha visto favorecida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESI, A.S., Benitende, S., Cassán, F. y Peticari, A. (2013). *Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes*. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
- ATLAS, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media* (4a ed.) EE.UU.: Ed. ASM Press, CRC Press.
- BRENNER, D.J., Krieg, N.R. y Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. The Proteobacteria (2a ed.) Nueva York: Ed. Springer.
- CAPPUCCINO, J.G. y Welsh, C. (2018). *Microbiology – A laboratory manual* (11a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], Sección de Microbiología de suelos del Programa de Pastos Tropicales, Sección de Microbiología de suelos del Programa de Frijol y Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno (comps.) (1988). *Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de Métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. España: Ed. Paraninfo.
- DREW, E., Herridge, D., Ballard, R., O'Hara, G., Deaker, R., Denton, M., Yates, R., Gemell, G., Hartley, E., Phillips, L., Seymour, N., Howieson, J. y Ballard, N. (2012). *Inoculating legumes: a practical guide*. EE.UU.: Ed. Grains Research and Development Corporation.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología básica, ambiental y agrícola* (1a ed.) Uruguay: Orientación Gráfica Editora.
- GAMAZO, C., Sánchez, S. y Camacho, A.I. (2013). *Microbiología basada en la experimentación*. España: Ed. Elsevier.
- HUNGRÍA, M. y Araujo, R.S. (1994). *Manual de métodos empregados em estudos de Microbiología agrícola*. Brasilia: Ed. Embrapa.
- ISO (2009). *Soil quality. Sampling. Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory* [ISO 10.381-6:2009]. Disponible en <https://www.iso.org/standard/43691.html>
- MADIGAN, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. y Stahl, D.A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- MARGESIN, R. y Schinner, F. (2005). *Manual for soil analysis. Monitoring and assessing soil bioremediation*. EE.UU.: Ed. Springer.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación [FAO] (1995). *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa*. Ed. FAO.
- PARK TALARO, K. y Chess, B. (2012). *Foundations in Microbiology* (8a ed.) EE.UU.: Ed. Mac Graw Hill.
- PAUL, E.A. (2015). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (4a ed.) EE.UU.: Ed. Academic Press.
- SOMASEGARAN, P. y Hoben, H.J. (1994). *Handbook for Rhizobia. Methods in legume-Rhizobium Technology*. EE.UU.: Ed. Springer-Verlag New York.
- TATE, R.L. (2021). *Soil Microbiology* (3a ed.) EE.UU.: Ed. Wiley Blackwell.
- TORTORA, G.J., Funke, B.R. y Case, C.L. (2019). *Microbiology – an introduction* (13a ed.) EE.UU.: Ed. Pearson.
- VAN ELSAS, J.D., Trevors, J.T., Soares Rosado, A. y Nannipieri, P. (2019). *Modern soil Microbiology* (3a ed.) EE.UU.: Ed. CRC Press.
- VERMA, D.K. (2019). *Microbiology for sustainable agriculture, soil health, and environmental protection*. EE.UU.: Ed. Apple Academic Press.
- VINCENT, J.M. (1975). *Manual práctico de Rizobiología*. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur.
- YATES, M.V., Nakatsu, C.H., Miller, R.V. y Pillai, S.D. (2016). *Manual of environmental microbiology* (4a ed.) EE.UU.: Ed. ASM Press.

Determinación
de la actividad biológica
PARTE 2

Capítulo 1. Medición de la actividad respiratoria para detectar actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero,
Cecilia Martín y María C. Iglesias

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 existentes en el suelo. 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 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. Por lo tanto, la actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede ser medida mediante el desprendimiento de CO_2 o el consumo de O_2 (García Izquierdo *et al.*, 2003).

El tipo de manejo que se le realice al suelo afecta de algún modo la calidad del mismo y su capacidad para funcionar dentro de los límites del ecosistema, perturbando su productividad biológica. El estudio de la calidad biológica y bioquímica de un suelo puede servir como indicador de su estado general. Para esto, son necesarios parámetros de actividad microbiana que ayuden a conseguir este conocimiento, y la respiración de los microorganismos del suelo es uno de ellos (Doran y Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 1997; Doran y Zeiss, 2000; Doran, 2002; Hernández y García, 2003).

La respiración del suelo tiene un claro significado ecológico y una enorme importancia dentro del conocimiento de la calidad y salud del mismo. Es uno de los parámetros más antiguos y más frecuentemente usados para cuantificar la actividad microbiana en el suelo. El uso de este índice microbiológico ha permitido estimar la actividad general de la biomasa y cómo esta es influenciada

por el clima, las propiedades físicas y químicas o prácticas de manejo agrícola, tales como la labranza y las rotaciones de cultivos (Martínez, Fuentes y Acevedo, 2008).

Todas las investigaciones se han basado en incubaciones de suelo, ya sea *in situ* o en laboratorio, con medición de productos finales como el CO₂, lo que ha permitido conocer la mineralización y estabilidad del carbono con relación a la cantidad y calidad de la materia orgánica presente y las prácticas de manejo agronómico (Campbell *et al.*, 1992).

En la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE) se estandarizó una técnica para la determinación de la actividad respiratoria mediante la captación de CO₂, realizando ajustes a técnicas descritas anteriormente por otros autores (Öhlinger, 1996; Frioni, 2011) y, de esta forma, se han podido estudiar numerosos ensayos donde se aplican diferentes prácticas de manejo agrícolas.

1.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El suelo es incubado en un sistema aeróbico cerrado, tanto con humedad como con temperatura constante y controlada. El CO₂ producido es absorbido en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) que es posteriormente valorada por titulación con un ácido.

1.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

Cuantificar la actividad microbiana en un sistema aeróbico para detectar diferencias que puedan estar asociadas a prácticas agrícolas o a una acción antrópica.

1.3. EQUIPAMIENTO

Los elementos necesarios para detectar la respiración microbiana son los siguientes.

- Estufa para incubación
- Frascos y bolsas para incubación
- Pipetas
- Buretas
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.4. REACTIVOS

Los reactivos que se necesitan son los detallados a continuación.

- Ácido clorhídrico 0,5 N
- Hidróxido de sodio 0,5 N
- Cloruro de bario 2%
- Fenolftaleína (indicador ácido-base).

1.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se trabaja con muestras de suelo secas al aire, molidas y tamizadas con malla de 2 mm.

1.6. PROCEDIMIENTO

Este método se basa en la cuantificación de CO₂ desprendido durante la incubación del suelo en un sistema cerrado. El CO₂ es atrapado en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) que es posteriormente valorada con ácido clorhídrico (HCl) (Öhlinger, 1996; Frioni, 2011).

1.6.1. Humedecimiento de la muestra a incubar

Se deben colocar 30 g de suelo en un recipiente y se procede al agregado de gotas de agua con una pipeta Pasteur, mientras se remueve la mezcla con una cuchara, a modo de lograr la homogeneidad de la muestra tanto en contenido de humedad como en color. La finalidad es lograr una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (García Izquierdo *et al.*, 2003) que, de acuerdo con una gran base de datos generada en el laboratorio de la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE), se pudo estimar que correspondería al 20 o 30% de la capacidad máxima de retención hídrica, según el tipo de suelo.

Luego, se registran 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:

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

1.6.2. Armado de los dispositivos de incubación

Se prepara un frasco por cada muestra que se quiera estudiar y en cada frasco se cargan 40 ml de una solución de hidróxido de sodio

(NaOH) 0,5 N. La muestra de suelo humedecida se introduce en una bolsita de polietileno de 30 micrones de espesor, puesto que este material es permeable a los gases (CO₂, O₂) e impermeable al vapor de agua.

Después, la bolsita con suelo se coloca de tal forma que quede 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. De esta manera, se generan tratamientos testigo o blancos -2 o 3, según el tamaño de la serie de muestras para analizar- y se cargan con los 40 ml de NaOH, pero sin la bolsita con suelo.

1.6.2.1. Incubación

Se llevan las muestras a incubación en estufa a 28 o 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 que justifica la relevancia del uso de la estufa para que todas las muestras estén sometidas a igual temperatura durante su incubación.

1.6.2.2. Titulación

En esta operación se realiza la medición por retrovaloración de la captación de CO₂ en solución alcalina. Se toma una alícuota de 10 ml de NaOH 0,5 N del frasco y se vierte en un vaso de precipitado, se le agregan unas gotas de cloruro de bario (BaCl₂) a fin de precipitar todo el CO₂ absorbido y unas gotas de fenolftaleína (indicador ácido-base) que torna de color fucsia a la solución. Esta operación se realiza por duplicado para cada muestra a fin de reducir el error en la titulación cuando se trabaja con un promedio. Con el empleo de una bureta, se aplica gota a gota el HCl 0,5 N hasta que el indicador vire de fucsia a incoloro, se registran los ml utilizados y se titulan tanto las muestras como los tratamientos «blanco».

1.7. CÁLCULOS

El CO₂ producido y liberado por la muestra se calcula por diferencia entre el título promedio de los blancos (para reducir el error operativo) y el título promedio de cada una de las muestras, y se aplica la siguiente fórmula, teniendo en cuenta todos los componentes presentes en el procedimiento.

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

Donde: B es el promedio de los ml de HCL gastados en la titulación de los blancos, M son los ml de HCL gastados en la muestra en cuestión, N es la normalidad del ácido, 22 es el peso equivalente del CO₂, 40 son los ml del hidróxido de sodio colocados en el frasco, 100 son los g de suelo de referencia para la determinación, 10 son los ml de la alícuota titulada y 30 son los g de suelo colocados en la bolsita.

En caso de ser necesario, se pueden obtener los mg CO₂.100g de suelo⁻¹.día⁻¹, dividiendo el resultado de la fórmula anterior por 7.

1.7.1. Resultados obtenidos en la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE

A continuación, se desarrollan los resultados obtenidos.

1.7.1.1. Determinación de respiración para detectar diferencias entre manejos agrícolas

Para este ejemplo, se trabajó con muestras provenientes de un ensayo instalado en la localidad de Monte Buey, Córdoba, cuyo diseño era una estructura factorial de tratamientos, donde se consideraban tres factores con dos niveles cada uno:

- a. Fertilización. Sin fertilización (F1) y máxima fertilización con reposición de macro y micronutrientes (F2).
- b. Siembra directa. Siembra directa interrumpida con una labor agrícola (SD1) y siembra directa continuada (SD2).
- c. Rotación. Rotación estándar de cultivos con 1,4 cultivos anuales (R1) y rotación intensiva con mayor incorporación de gramíneas y 1,8 cultivos anuales (R2).

De esta forma, con la combinación de estos factores y sus niveles, quedaron definidos ocho tratamientos. Luego de realizar la medición de la actividad respiratoria por el método descripto, se obtuvieron los mg CO₂.100g de suelo⁻¹.día⁻¹.

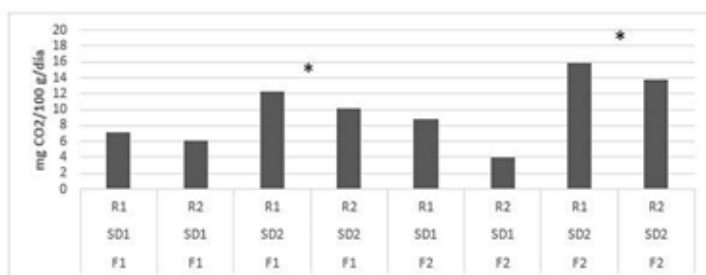


Figura N° 1. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos generados de la interacción de factores y niveles. *Los tratamientos con SD2 fueron mayores significativamente a los SD1 (tukey $p \leq 0,05$).

Se pudo observar una variabilidad en los datos de respiración obtenidos, relacionada a las prácticas agrícolas que se estudiaron en este ensayo. Luego de realizar el Anava (análisis de varianza) con el estadístico tukey ($p \leq 0,05$), se observó diferencias significativas entre los niveles de siembra directa, siendo SD2 mayor a SD1 significativamente, dentro de cada nivel de fertilidad. Es decir, se dio esta situación tanto en F1 como en F2. Las rotaciones no mostraron diferencias significativas. Cabe destacar que los datos aquí presentados corresponden a un trabajo realizado en conjunto entre la cátedra de Microbiología Agrícola de FCA-UNNE y el Grupo Romagnoli, en el establecimiento La Lucía (Monte Buey, Córdoba).

1.7.1.2. Actividad respiratoria en suelos con diferentes manejos agrícolas (Biospas)

Dentro del marco del proyecto Biología de suelos y producción agrícola sustentable (Biospas) se eligieron cuatro ambientes siguiendo una transecta oeste-este en la Argentina, en las localidades de Bengolea (BG) y Monte Buey (MB) en Córdoba, Pergamino (PG) en Buenos Aires y Viale (VL) en Entre Ríos. En todos se definieron tres tratamientos de uso del suelo bajo siembra directa, de acuerdo a la productividad sustentable, según los registros de los agricultores:

- Ambiente natural (AN), monte o pastizal como referencia del sitio.
- Buenas prácticas agrícolas (BP), gestión con rotación intensiva de cultivos, reposición racional de nutrientes y manejo integral de plagas y enfermedades.
- Malas prácticas agrícolas (MP), gestión con tendencia al monocultivo y sin reposición de nutrientes.

Cada muestra consistió en un compuesto de entre 16 y 20 submuestras de suelo a una profundidad de 0 a 10 cm en un área de 5 m², tomadas por triplicado, a intervalos de al menos 50 m distribuidos en el lote, evitando seguir la línea de siembra.

Se evaluaron cinco campañas de muestreo:

- Invierno de 2009 (Inv. 2009)
- Febrero de 2010 (F 2010)
- Septiembre de 2010 (S 2010)
- Febrero de 2011 (F 2011)
- Septiembre de 2011 (S 2011).

Utilizando el método antes descrito, se pudieron obtener los siguientes resultados.

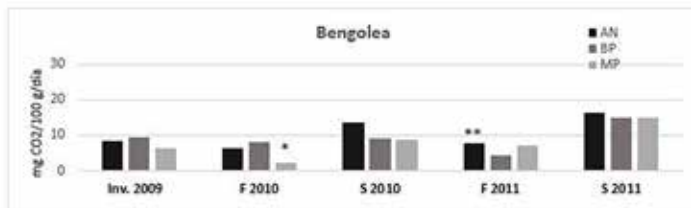


Figura N° 2. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Bengolea, en cada campaña de muestreo: *MP<BP y AN, **AN>BP y MP (tukey $p \leq 0,05$).

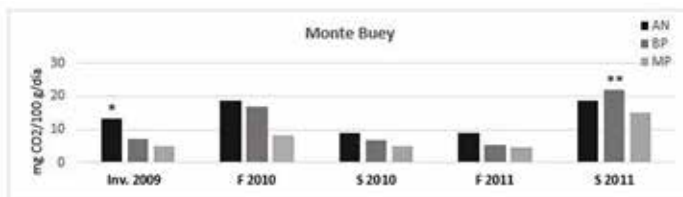


Figura N° 3. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Monte Buey, en cada campaña de muestreo: *AN>MP, **BP>MP (tukey $p \leq 0,05$).

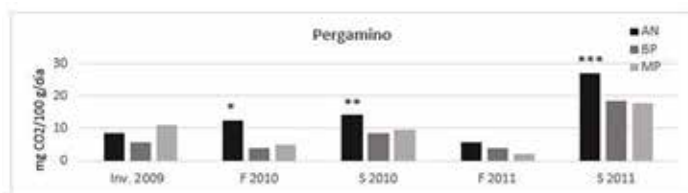


Figura N° 4. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Pergamino, en cada campaña de muestreo: *AN>BP y MP, **AN>BP, ***AN>MP (tukey $p \leq 0,05$).

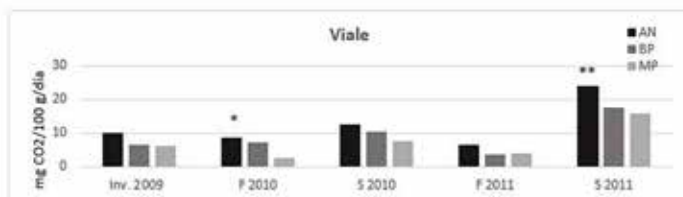


Figura N° 5. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en Viale, en cada campaña de muestreo: *y**AN>MP (tukey $p \leq 0,05$).

En este ejemplo, la actividad respiratoria, cuantificada a partir del procedimiento presentado, sirvió para detectar muchas diferencias relacionadas al manejo agrícola en los diferentes sitios a través de los diferentes muestreos.

En la mayoría de las comparaciones hay una tendencia a ser el MP menor, como en el caso de Bengolea, que lo fue significativamente en F 2010. Así también, en la mayoría de las comparaciones, el AN es el mayor, como en Monte Buey, en Inv. 2009, con diferencia significativa. En este sitio también el BP mostró mayor valor en S 2011.

La situación del AN con mayor actividad respiratoria se puede corroborar en Pergamino, con diferencias con relación a los tratamientos con impacto agrícola. Situación similar se da en algunos muestreos en Viale. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del Programa de Áreas Estratégicas (2007-2011), Biología del suelo y producción agraria sustentable-Biospas de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (ANPCyT).

1.7.1.3. Ensayo de utilización de abonos orgánicos en producción hortícola

Se utilizaron muestras de suelo de un Hapludert típico, provenientes de un ensayo realizado en el marco de un proyecto de investigación en el que participaron la cátedra de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCyF-UNLP), el Inta

La Plata y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE. El ensayo se realizó en la localidad de Gorina, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires, en un sistema intensivo de producción hortícola bajo cobertura plástica y fertirriego por goteo.

Con la hipótesis de que la enmienda orgánica utilizada habitualmente por los productores del lugar, en general cama de pollo sin previo proceso de compostaje, producía efectos adversos a largo plazo, entendiéndose salinización, alcalinización, desbalance de nutrientes, y en búsqueda de alternativas superadoras que permitan mejorar las propiedades del suelo, se realizó el ensayo en cuestión y se compararon los siguientes tratamientos:

- T1: sin aplicación de enmiendas.
- T2: agregado de cama de pollo conforme se realiza en la región. Es decir, sin previo compostaje y en dosis aproximada equivalente a 30 y 40 tn/ha, que representa en volumen, 100 m³/ha.
- T3: agregado de compost de cama de pollo, en dosis correspondiente al contenido de materia orgánica del T2.
- T4: agregado de compost de cama de pollo, con doble dosis del T3.

Cada tratamiento contó con 4 repeticiones, obteniendo un total de 16 parcelas y se tomaron muestras a 2 profundidades: 0-15 cm (superficie) y 15-30 cm (profundidad). Conforme a lo mencionado, se trabajó con un total de 32 muestras.

Se realizaron 4 muestreos y se midió la respiración microbiana utilizando el método antes descrito. Se pudieron obtener los siguientes resultados:

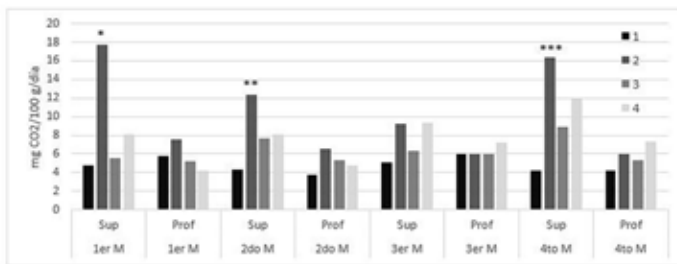


Figura N° 6. Actividad respiratoria para cada uno de los tratamientos en las diferentes profundidades de muestreo a lo largo de los cuatro muestreos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas para el T2 (tukey $p < 0,05$).

Si bien, en profundidad, las diferencias no fueron significativas, en superficie se detectó que en tres de los cuatro muestreos el T2 presentó mayor actividad microbiana, correspondiendo este tratamiento al uso de enmienda orgánica fresca sin compostaje previo, por lo que la actividad microbiana estaría más estimulada para la mineralización del mismo frente a los materiales estabilizados con el compostaje. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto Evaluación de enmiendas orgánicas sobre el suelo y cultivos hortícolas protegidos de la cátedra de Edafología de la FCAYF-UNLP y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

En resumen. Con la utilización de esta técnica para la determinación de la actividad respiratoria mediante la captación de CO₂, se han obtenido resultados en numerosos ensayos, donde se aplicaron diferentes prácticas de manejo agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPBELL, C.A, Brandt, S.A., Biederbeck, V.O., Zentner, R.P. y Schnitzer, M. (1992). «Effect of crop rotations and rotation phase on characteristics of soil organic matter in a Dark Brown Chernozemic soil». *Canadian Journal of Soil Science*, 72, 403-416.
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assensing soil quality». *En Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Special Publication, 35. EE.UU.: Soil Science Society of America.
- DORAN, J.W. y Zeiss, M.R. (2000). «Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality». *Applied Soil Ecology*, 15, 3-11.
- DORAN, J.W. (2002). «Soil health and global sustainability: translating science into practice». *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 88, 119-127.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.

- GARCÍA IZQUIERDO, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T. y Trasar Cepeda, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Ediciones Mundi-Prensa.
- HERNÁNDEZ, T. y García, C. (2003). «Estimación de respiración microbiana del suelo». En García, C., Gil, S., Hernández, T. y Trasar, C. (eds.) *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos* (pp. 311-346). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- MARTÍNEZ, H., Fuentes, J.P. y Acevedo, H.E. (2008). «Carbono orgánico y propiedades del suelo». *Soil Science and Plant Nutrition*, 8(1), 68-96.
- KARLEM, d.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F. y Schuman, G.E. (1997). «Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation». *Soil Science Society America*, 61, 4-10.
- ÖHLINGER, R. (1996). «Soil respiration by titration». En Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. y Margesin, R. (eds.) *Methods in Soil Biology* (pp. 95-98). Berlín: Springer-Verlag.

Capítulo 2. Carbono de la biomasa microbiana del suelo. Método de fumigación-extracción

Cristina E. Sotelo, Andrea A. Sirio
y Germán L. Pérez

La importancia de la determinación del carbono en la biomasa microbiana se debe al papel principal de los microorganismos del suelo en la retención como en la liberación de nutrientes y energía del sistema. Este parámetro ha sido empleado como bioindicador de los cambios en la materia orgánica del suelo, por representar un índice más sensible que el carbono orgánico total. El carbono orgánico extraído en una solución de sulfato de potasio es determinado en muestras de suelo fumigadas con cloroformo (biocida) y no fumigadas, y el carbono de su constitución es valorado por dicromatometría. El incremento en las cantidades de carbono en las muestras fumigadas con respecto a los controles es considerado como carbono de la biomasa microbiana del suelo.

La biomasa microbiana del suelo se define como el componente microbiano vivo del suelo (Sparling, 1985) que, al ser microbiano, excluye a la macrofauna y a las raíces de las plantas (Jenkinson y Ladd, 1981). La importancia de la determinación del carbono de la biomasa microbiana se debe al papel principal que juega la materia orgánica del suelo, por representar un índice más sensible que el carbono orgánico total, debido a que en este último existe un elevado porcentaje de fracciones muy estables, que pueden llegar a enmascarar las alteraciones de aquellas fracciones más susceptibles de cambio (Powlson y Jenkinson, 1981).

La biomasa microbiana del suelo tiene las siguientes funciones:

- a. Es una fuente lábil o un sumidero inmediato para el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Dalal, 1998), de forma que regula la transformación de la materia orgánica (Gregorich *et al.*, 1994; Turco, Kennedy y Jawson, 1994).
- b. Conduce la transformación de nutrientes (Smith y Paul, 1990).

c. Es un agente cementante de los agregados del suelo (Chan y Heenan, 1999).

La biomasa se encuentra principalmente constituida por bacterias y hongos, aunque también forman parte de ella la microfauna del suelo y las algas. Es una fracción enormemente importante de la materia orgánica del suelo, pese a que representa solo entre un 1 y un 5% del total de la misma (Jenkinson, 1988). Esta proporción tiende a ser mayor en los suelos arcillosos que en los arenosos (Wardle, 1992), aparentemente debido al proceso protector de las arcillas sobre la biomasa microbiana (Mercx, Den Hatog y Van Veen, 1985; Van Veen, Ladd y Amato, 1985).

La biomasa microbiana se renueva mucho más rápido que el resto de la materia orgánica (Jenkinson y Ladd, 1981; Paul, 1984), lo que hace que se haya sugerido el empleo de la misma como indicador de la calidad del suelo.

Por otra parte, diversos autores (Powlson y Jenkinson, 1981; Powlson, Brookes y Christensen, 1987; Sparling, 1992) han sugerido que las variaciones del contenido de la biomasa microbiana en los suelos reflejan tendencias a largo plazo en los contenidos de materia orgánica y, debido a ello, se ha recomendado como indicador del carbono orgánico del suelo. Varios estudios han puesto de manifiesto la importante relación existente entre la biomasa microbiana, la velocidad de descomposición de la materia orgánica y la mineralización del nitrógeno (Jenkinson, 1988, Carter *et al.*, 1999). Para evaluar la biomasa microbiana se utilizan varios métodos, en este capítulo describiremos el de fumigación-extracción.

2.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La determinación de la biomasa microbiana mediante fumigación con cloroformo abarca dos técnicas diferentes: el método de fumigación-incubación (CFI) y el método de fumigación-extracción (CFE), de acuerdo con Brookes *et al.* (1985) y Vance *et al.* (1987). En ambos casos, los vapores de cloroformo matan a los microorganismos del suelo y se diferencian en la forma de medir el tamaño de la biomasa muerta.

En el método CFI se estima por cuantificación del CO₂ respirado tras un período específico de incubación, mientras que en el CFE se determina por extracción directa del suelo tras la fumigación, seguida de cuantificación del carbono extraíble. Este último método ha venido sustituyendo al anterior, debido a su rapidez, ya que evita el período de incubación de 10 días.

Otro método indirecto empleado comúnmente es el de respiración inducida por sustrato (SIR). Este método tiene en cuenta solamente la fracción metabólicamente activa de la biomasa microbiana (Carter *et al.*, 1999), a partir de medidas del cambio inicial en la velocidad de respiración del suelo como consecuencia de la adición de un sustrato fácilmente degradable (glucosa), según Anderson y Domsch (1978).

El único inconveniente que presentan los métodos indirectos es que solo permiten cuantificar la biomasa microbiana, sin detallar su composición (Bailey *et al.*, 2002), de modo que la biomasa microbiana representaría una «caja negra» que permite conocer poco sobre la estructura de la comunidad microbiana o de los procesos que tienen lugar en dicha comunidad (Dalal, 1998).

Una de las ventajas del método CFE es que implica la extracción con K_2SO_4 0,5 M, por lo que en esta determinación también se obtiene una medida de carbono lábil (Haynes, 2005). La extracción de carbono con K_2SO_4 simula la solución del suelo, que es el principal recurso para que los microorganismos obtengan nutrientes. Por lo tanto, esta medida de carbono –en adelante se hará referencia a ella como carbono lábil– puede emplearse como medida del carbono actualmente disponible para los microorganismos (West *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1998).

La metodología de CFE utiliza también cloroformo, porque es un biocida efectivo y no solubiliza la materia orgánica del suelo no microbiana (Jenkinson, 1976); los microorganismos del suelo son lisados y valorados por dicromatometría (Page, 1982). El C (carbono) y N (nitrógeno) orgánico extraídos en una solución de sulfato de potasio (0,5 M) son determinados en muestras de suelo fumigadas y no fumigadas. El incremento en las cantidades de C y N determinados en las muestras fumigadas con respecto a los controles son considerados como carbono y nitrógeno de la biomasa microbiana del suelo.

Los principios de este método, de acuerdo con Paz Ferreiro (2006), son:

- La fumigación del suelo mata la biomasa microbiana y no afecta la materia orgánica no viva.
- El número de organismos muertos en el suelo no fumigado es insignificante comparado con el del suelo fumigado.
- La fracción del carbono mineralizado de la biomasa microbiana muerta en un período de tiempo de 10 días no difiere en diferentes suelos.

El cloroformo es escogido como fumigante debido a que es un producto comercial más fácil de remover del suelo que el

metilbromido, formaldehído y el cloropicrín. Para el método que describimos, el cloroformo debe estar libre de etanol, que generalmente se encuentra en la presentación normal del reactivo.

El cloroformo provoca la muerte celular al lisar las membranas celulares. La lisis de las células microbianas depende del tiempo, de la temperatura, así como de la localización de los microorganismos en la estructura y características del suelo, tales como porosidad y materia orgánica, arcilla y contenido de carbonatos. Es por eso que es importante utilizar un factor de corrección (kc) para obtener valores más aproximados.

El valor kc se considera constante para todos los suelos sin importar el tipo de microorganismos que existan en ellos. Sin embargo, se encuentran muchos trabajos en los que se cuestiona dicha afirmación. Lynch y Panting (1980) reportan que la fumigación con cloroformo mata el 82 y 89% de las bacterias y cerca del 99% de los hongos en un suelo arcilloso. Hu y Van Bruggen (1998) encontraron que la eficiencia de fumigación con cloroformo para bacterias es de 98,5 a 93,46%. Toyota *et al.* (1996) proponen que esta diferencia puede deberse a los exopolisacáridos secretados por las bacterias que las protegen de la acción del cloroformo, así como a la propia matriz del suelo cuando estas están embebidas en ella, y Anderson y Domsch (1978) encontraron que el promedio de la mineralización de hongos y bacterias no es el mismo después de la fumigación, datos contrarios a los encontrados por Jenkinson y Powlson (1976). Como en los suelos de la región aún no se determinó el valor de Kc, para las determinaciones se utiliza un $kc=0,35$, basado en datos bibliográficos.

2.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo de la determinación de biomasa microbiana es conocer los valores para poder comparar distintas situaciones de manejo y construir índices de calidad de suelos a partir de los datos obtenidos.

Estos índices son útiles para decidir acciones con relación a la prevención, al monitoreo, a los servicios ambientales y a la valoración de tierras (Albanesi, 2013). La identificación de indicadores que permitan monitorear o predecir la degradación del recurso suelo resulta fundamental, ya que los grandes problemas agroecológicos pueden ser traducidos sobre la base de criterios que pueden ser medidos. Se plantea que las características más dinámicas del suelo, tales como la biomasa microbiana, responden más rápidamente a los cambios en las prácticas de manejo o condiciones ambientales. En este capítulo desarrollaremos la metodología de

fumigación-extracción, describiendo los procedimientos con algunos detalles importantes a tener en cuenta para el desarrollo de la misma.

2.3. EQUIPAMIENTO

Los equipamientos necesarios para la realización de la marcha son:

- Plancha digestora a 140 °C o digestor automático
- Centrífuga (2000 rpm)
- Espectrofotómetro (590 nanómetros)
- Agitador orbital.

2.4. REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para realizar las soluciones, se deben secar los reactivos en estufa a 100 °C durante 1 h; según qué solución se desea preparar, los mismos se detallan en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Reactivos y preparación de soluciones

Reactivo	Fórmula química y peso molecular	Preparación de la disolución
Sulfato de potasio 0,5 M (*)	K_2SO_4 PM 174,5 g/mol	87,250 g en 1000 ml de agua destilada
Dicromato de potasio 0,0667 M	$K_2Cr_2O_7$ PM 294,2 g/mol	1,992 g en 100 ml de agua destilada
Ácido sulfúrico	H_2SO_4 PM 98.079 g/mol	Proanálisis
Biftalato de potasio(**) Concentración final: 3 g C.L⁻¹	$KC_8H_5O_4$ PM 204,220 g/mol	6,382 g en 1000 ml de agua destilada
Glucosa Concentración final: 3 g C.L⁻¹	$C_6H_{12}O_6$ PM 180 g/mol	7,500 g en 1000 ml de agua destilada

* Preparar 1 hora antes, ya que tarda mucho en disolverse. Se puede calentar la solución para acelerar.

** Biftalato de K (sinónimos: ftalato de potasio e hidrógeno, ftalato ácido de potasio, ácido ftálico, sal de potasio, ácido 1,2, bencenodicarboxílico, sal monopotasio).

2.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

La limpieza del material del laboratorio es importante porque mediante ese proceso eliminaremos residuos de sustancias y polvo que interfieren en las reacciones de los análisis. Existen distintos procedimientos para este fin, por lo que a continuación detallaremos uno de ellos.

- Lavar el material de vidrio y plástico con cepillo, cuidando que no queden residuos de ningún tipo.
- Lavar con una solución de HCl (4 ml de HCl por cada 3 l de agua).
- Enjuagar con agua corriente 3 veces.
- Enjuagar con agua destilada (2 o 3 veces, aproximadamente).
- Secar el material de vidrio recién lavado en la estufa (controlar que la temperatura no supere los 40 °C).

2.6. PROCEDIMIENTO

Para realizar la marcha, debemos elaborar una curva patrón. La misma es una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utilizará para determinar la cantidad de esa sustancia en la muestra problema.

2.6.1. Curva patrón

En la construcción de la curva patrón se pueden elegir dos reactivos: glucosa o biftalato de potasio –según nuestra experiencia, es más estable el biftalato–. La concentración y preparación de la solución madre patrón se vio en el apartado 2.4. Reactivos y preparación de soluciones.

Tabla N° 2. Dilución del compuesto patrón elegido

<u>ml de solución madre patrón</u>	<u>ml de agua destilada</u>	<u>Concentración final obtenida (g de C L⁻¹)</u>
0	100	0
0,5	99,5	0,015
1	99	0,03
1,5	98,5	0,045
2	98	0,06

1. Lavar el material como se ha indicado anteriormente.
2. Utilizar 4 a 5 matraces de 100 ml; si se utilizan 4 matraces, el agua destilada se puede pipetear de un vaso de precipitados lavado correctamente.
3. Realizar las diluciones del compuesto patrón elegido (en los matraces apropiados), en las proporciones de la Tabla N° 2.
4. Trabajar con estas diluciones como si se tratase de la muestra (procesarlas de igual manera, tomando 4 ml de las diluciones realizadas).
5. Agregar 4 ml de la dilución al balón de digestión (un tubo por dilución), adicionar 1 ml de dicromato de potasio 0,0667 M y, por último, 4 ml de H₂SO₄ con el cuidado de agitar cada 1 ml dispensado (reacción muy exotérmica); al finalizar, pasar por el vórtex para homogeneizar. Recordar que por cada dilución se utiliza una pipeta distinta.
6. Digerir a 140 °C en la placa digestora durante 30 minutos.
7. Dejar enfriar¹. Encender el espectrofotómetro, aproximadamente 30 minutos antes de la determinación, de manera que se establezca el equipo. Ajustar la longitud de onda a 590 nm.
8. Agregar 1 ml de agua destilada. Si se observan variaciones de densidad, debe agitar 2-3 pulsos de vórtex hasta que desaparezca.
9. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm².
10. Con los valores obtenidos de absorbancia, realizar la regresión lineal. Para el mismo, se cargan en una planilla de cálculo los datos y se realiza un gráfico de dispersión. En la abscisa se cargan las concentraciones y en la ordenada, el origen de las lecturas de absorbancia. Se le pide al programa la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión –es recomendable que los valores del coeficiente sean igual o mayor a 0,99–, y con esos datos de la ecuación después realizaremos los cálculos (Figura N° 1).

La regresión lineal ajustada –realizada con la curva patrón– a la ecuación

$$Y=a+b*x$$

1. Evitar el cambio brusco de temperatura cuando se terminen de digerir las muestras, ya que se generan partículas en suspensión que interfieren luego en la lectura del espectrofotómetro.

2. Tener la precaución de usar guantes y de colocar un papel absorbente alrededor de donde se trabaje, ya que la solución usada es corrosiva (leer la ficha de seguridad de este reactivo).

Siendo: a la ordenada al origen (constante) y b la pendiente (g de C L⁻¹ de glucosa o biftalato de K). Entonces:

$$g \text{ de C L}^{-1} = (Y-a)/b$$

Siendo: Y el valor de absorbancia leída.

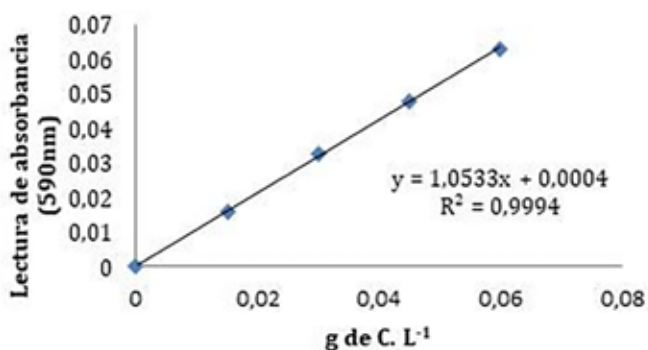


Figura N° 1. Gráfico de dispersión realizado con los datos de la curva patrón, donde se observa la ecuación de la recta y el R².

2.6.2. Obtención del extracto de la muestra

Una vez obtenida la curva patrón, se debe extraer del suelo problema el carbono de la biomasa microbiana, la misma se realiza en dos días. El primero, de incubación y el segundo, de extracción y lectura.

Día 1

1. Pesar 7,5 g de suelo en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
2. Agregar al suelo, ubicado en posición tipo pico de flauta para ampliar la superficie de mojado, 2,5 ml de agua destilada (relación 3:1, suelo: agua). Tapar en forma no hermética (tapón apoyado, tapón sin rosca o tapón de aluminio).
3. Incubar durante 15 horas, \pm 1h a 30 °C en la oscuridad (estufa). Hacer 6 tubos por muestra.

Día 2

1. Fumigar tres tubos de una muestra con 0,4 ml de cloroformo libre de etanol durante 30 minutos tapando herméticamente, con tapa a rosca o tapones de goma si los tubos no tuvieran rosca. Los otros tres tubos no se fumigan y se constituyen en blancos sin cloroformo.



Figura N° 2. Tubos con suelos humedecidos en forma de pico de flauta y colocados en la gradilla para llevar a incubar.

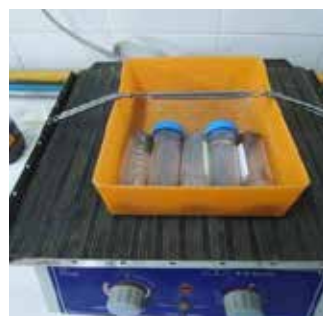


Figura N° 3. Agitación de los tubos en forma horizontal.

2. Agregar a todos los tubos el extractante: 30 ml de K_2SO_4 0.5 M.
3. Agitar 1 hora en agitador mecánico, acostando los tubos cerrados herméticamente.
4. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
5. Filtrar con papel de filtro banda azul y recoger el extracto en tubos tipo Falcon de 50 ml limpios. Los extractos se pueden guardar en heladera para su uso en los próximos 2 o 3 días, o en freezer durante un tiempo prolongado. Es común la aparición de un mucílago en el extracto –mencionado en las normas ISO 14240-2– y ello no modifica el resultado. No obstante, hay que evitar tomar el mucílago con la pipeta en la alícuota para la determinación del carbono de la biomasa microbiana (CBM), porque ello complica la determinación por espectrofotometría. Si se realiza el mismo día la digestión de la muestra, centrifugar el extracto antes; si se realiza al día siguiente, el reposo favorece la precipitación de ese mucílago.

2.6.3. Digestión del extracto y lectura en el espectrofotómetro

Para determinar el carbono de la biomasa microbiana, se realiza una digestión del extracto y posterior lectura en espectrofotómetro.

1. Agregar 4 ml del extracto al tubo de digestión previamente rotulado (un tubo por extracto), adicionar 1 ml de dicromato de potasio 0,0667 M y, por último, agregar 4 ml de H_2SO_4 con el cuidado de ir agitando cada 1 ml dispensado (reacción muy exotérmica). Al finalizar, pasar por el vórtex para homogeneizar. Recordar que por cada extracto se utiliza una pipeta distinta.
2. Realizar en un tubo un blanco, en el que en vez de la muestra, se colocan 4 ml de agua destilada. Este se realiza para cada tanda de determinaciones, ya que es para llevar a cero el espectrofotómetro.
3. Digerir a 140 °C en la placa digestora durante 30 minutos.
4. Dejar enfriar. Mientras tanto, encender el espectrofotómetro, aproximadamente 30 minutos antes de la determinación, de manera que se estabilice el equipo. Ajustar la longitud de onda a 590 nm.
5. Agregar 1 ml de agua destilada. Si se observan variaciones de densidad, se debe agitar en 2-3 pulsos de vórtex hasta que desaparezca esa imagen.
6. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm. Tener la precaución de usar guantes y de colocar un papel absorbente alrededor de donde trabaje, ya que la solución de trabajo es corrosiva.



Figura N° 4. Centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos.



Figura N° 5. Filtrado de la muestra con filtro banda azul.

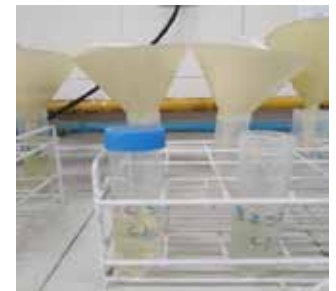


Figura N° 6. Recolección del extracto en tubos limpios.

2.7. CÁLCULOS

De acuerdo con la Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo y el Interlaboratorio de Comisión Biología de Suelos (2012), se calculó la cantidad de C (en g C L^{-1}) de la muestra, con la lectura de absorbancia medida en las muestras fumigadas y no fumigadas, por referencia a un gráfico de calibración de C de glucosa o de bitalato de K o de ftalato de K $\text{g C L}^{-1} = (\text{Absorbancia}-a)/b$. Siendo: a la ordenada al origen y b, la pendiente.

Luego, se transformó g C L^{-1} a $\mu\text{g C g de suelo}^{-1}$, siendo $\mu\text{g C g de suelo}^{-1} = ((\text{g de C L}^{-1}) * 30 / 7,5) * 1000$, y se calculó el carbono de la biomasa microbiana, siendo $\mu\text{g CBM g de suelo}^{-1} = \text{Fumigado} (\mu\text{g C g}^{-1}) - \text{No Fumigado} (\mu\text{g C g}^{-1}) / \text{kc}^3$ de 0,35.

En resumen. Para realizar el cálculo del carbono de la biomasa microbiana del suelo con el método fumigación-extracción, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Humedecer las muestras con 2,5 ml de agua destilada,
2. Incubar a 30 °C durante 15 h (no cerrar herméticamente los tubos),
3. Fumigar tres tubos de cada muestra con 0,4 ml de cloroformo por 30 minutos y tapar herméticamente –los otros tres tubos no se fumigan y se constituyen en blancos sin cloroformo–,
4. Agregar a todos los tubos el extractante: 30 ml de sulfato de potasio 0,5 M,
5. Agitar los tubos acostados y herméticamente cerrados una hora en agitador mecánico,
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos, filtrar con papel de filtro banda azul y recoger el extracto en tubos tipo Falcon de 50 ml limpios,
7. Agregar 4 ml del extracto al tubo de digestión previamente rotulado, 1 ml de dicromato de potasio y 4 ml de H_2SO_4 ,
8. Digerir a 140 °C en la placa digestora durante 30 minutos,
9. Dejar enfriar y agregar 1 ml de agua destilada a la digestión y homogeneizar,
10. Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm,
11. Realizar los cálculos.

3. El factor de corrección kc es tomado de la bibliografía, ya que para suelos del Nordeste argentino aún no se determinó.



Figura N° 7. Digestión del extracto a 140 °C por 30 minutos.



Figura N° 8. Extracto luego de la digestión, en el que se observan distintas coloraciones según el contenido de biomasa microbiana.



Figura N° 9. Celda del espectrofotómetro con el extracto a medir.



Figura N° 10. Espectrofotómetro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.P.E. y Domsch, K.H. (1978). «A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 10, 207-213.
- Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo e Interlaboratorio Comisión Biología de Suelos (2012). *Protocolo del Carbono de la biomasa microbiana por fumigación extracción*.
- BAILEY, V.L., Peacock, A.D., Smith, J.L. y Bolton, H. (2002). «Relationships between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis». *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1385-1389.
- BROOKES, P.C., Landman, A., Pruden, G. y 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*, 22, 725-727.
- CARTER, M.R., Gregorich, E.G., Angers, D.A., Beare, M.H., Sparling, G.P., Wardle, D.A. y Voroney, R.P. (1999). «Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions». *Canadian Journal of Soil Science*, 79, 507-520.
- CHAN, K. y Heenan, D. (1999). «Estabilidad de los agregados del suelo inducida por microbios bajo diferentes rotaciones de cultivos». *Biology and Fertility of Soils*, 30, 29-32. Disponible en <https://bit.ly/3rVRGGe>
- DALAL, R.C. (1998). «Soil microbial biomass. What do the number really mean?» *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 645-665.
- GREGORICH, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M. y Ellert, B.H. (1994). «Towards a minimum data set to assess soil organic-matter quality in agricultural soils». *Canadian Journal of Soil Science*, 74, 367-385.
- HU, S. y Van Bruggen, A.H.C. (1998). «Efficiencies of chloroform fumigation in soil: effects of physiological states of bacteria». *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1841-1844.
- JENKINSON, D.S. (1988). «Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil». En Wilson, J.R. (ed.) *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems* (pp. 368-386). Wallingford, UK: CAB.
- JENKINSON, D.S. y Ladd, J.N. (1981). «Microbial biomass in soil: measurement, and turnover». En Paul, E.A. y Ladd, J.N. (eds.) *Soil Biochemistry* (pp. 415-471). Vol. 5. Nueva York y Basel: Marcel Dekker Inc.
- JENKINSON, D.S. y 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.

- LYNCH, J.M. y Panting, L.M. (1980). «Cultivation and the soil biomass». *Soil Biology and Biochemistry*, 12, 29-33.
- MERCX, R., Den Hatog, A. y Van Veen, J.A. (1985). «Turnover of root-derived materials and related microbial biomass formation in soils of different texture». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 565-569.
- PAGE, A.L. (ed.) (1982). *Methods of soil analysis*. Parte 2. Chemical and microbiological properties. Madison, Wisconsin, USA: Agronomy 9, ASA, Soil Science Society of America.
- PAUL, E.A. (1984). «Dynamics of organic matter in soil». *Plant and Soil*, 76, 275-285.
- PAUL, E.A. y Voroney, R.A. (1989). «Field interpretation of microbial biomass activity and measurements». En Kleng, M.J. y Reedy, C.A. (eds.) *Current perspective in microbial ecology*. Washington DC, EE.UU.: American Society for Microbiology.
- PAZ FERREIRO, J. (2006). *Propiedad bioquímica de suelos de Galicia*. Tesis doctoral. España: Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia, Departamento de Edafología y Química Agrícola. Disponible en <https://bit.ly/3pW3SEp>
- POWLSON, D.S., Brookes, P.C. y Christensen, B.T. (1987). «Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation». *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 159-164.
- POWLSON, D.S. y Jenkinson, D. (1981). «A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen content of ploughed and direct drilled soils». *Journal of Agricultural Science*, 97, 713-721.
- SMITH, J.L. y Paul, E.A. (1990). «The significance of soil microbial biomass estimations». En Stotzky, G. y Bollag, J.M. (eds.) *Soil Biochemistry*, 6, 359-396. Dekker, Nueva York.
- SPARLING, G.P. (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.
- _____. (1985). «The soil microbial biomass». En Vaughan, D. y Malcolm, R.E. (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity* (pp. 223-262). Dordrecht, Países Bajos: Springer Science-Business Media Dordrecht.
- TANAKA, S., Funakawa, S., Kaewkhongkha, T. y Yonebayashi, K. (1998). «Labile pool of organic matter and microbial biomass in the surface soils under shifting cultivation in northern Thailand». *Soil Science and Plant Nutrition*, 44, 527-537.
- TOYOTA, K., Ritz, K. y Young, I.M. (1996). «Survival of bacterial and fungal populations following chloroform-fumigation: Effects of soil matrix potential and bulk density». *Soil Biology and Biochemistry*, 28(10), 1545-1547.

- TURCO, R.F., Kennedy, A.C. y Jawson, M.D. (1994). «Microbial indicators of soil quality». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (pp. 293-310). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- VAN VEEN, J.A., Ladd, J.N. y Amato, M. (1985). «Turnover of carbon and nitrogen through the microbial biomass in a sandy loam and a clay soil incubated with ^{14}C glucose and ^{15}N NH_4SO_4 under different moisture regimes». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 747-756.
- VANCE, E.D., Brookes P.C. y Jenkinson D.S. (1987). «An extraction method for measuring soil microbial biomass C». *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 703-707.
- WARDLE, D.A. (1992). «A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil». *Biological Reviews*, 67, 321-358.
- WEST, A.W., Sparling, G.P., Feltham, C.W. y Reynolds, J. (1992). «Microbial activity and survival in soils dried at different rates». *Australian Journal of Soil Research*, 30, 209-222.

Capítulo 3. Actividad hidrolítica de enzimas microbianas sobre diacetato de fluoresceína

Natalia Mansilla, Cristina E. Sotelo,
Natalia Banegas, Andrea A. Sirio y Emilce Viruel

Durante los últimos años ha aumentado el interés por conocer el tamaño y la actividad de la biomasa microbiana del suelo, en parte debido a la importancia de esta información en el bioecosistema integrado y en los estudios de cambio global. La actividad microbiana total proporciona una medida general del recambio de materia orgánica en hábitats, donde aproximadamente el 90% de la energía del suelo fluye a través de descomponedores microbianos (Green, Stott y Diack, 2006).

Entre los métodos de estudio para conocer la dinámica de la materia orgánica del suelo (MO) y la actividad microbiológica asociada, se encuentra la medición de las actividades enzimáticas, ya que la estabilización o degradación de la MO depende fundamentalmente de procesos biológicos en los que las enzimas cumplen un rol importante (Aguilera *et al.*, 1988; Nannipieri *et al.*, 2003). Las enzimas producidas por la actividad microbiana en el suelo están relacionadas con la fertilidad del mismo, ya que durante la descomposición de la MO los nutrientes pasan a través de la población microbiana y, mediante sus sistemas enzimáticos asociados, los compuestos complejos son degradados a subunidades simples y asimilables por las plantas (Nannipieri y Landi, 2000; Zahir, Ateeq y Arshad, 2001).

Las enzimas del suelo son importantes catalizadoras de procesos metabólicos, incluyendo la descomposición de compuestos orgánicos y xenobióticos. Considerando la capacidad de resiliencia del ecosistema –definiéndolo como un ente vivo y dinámico–, se puede pensar que cualquier cambio medioambiental podría ser detectado en su inicio por su componente biológico (por ejemplo, enzimas). De ahí que la presencia o deficiencia de enzimas

del suelo pueda ser considerada como un bioindicador sensible ante una posible perturbación ambiental (Ulloa Larrea, 2014). Pueden ser «sensores», ya que entregan información sobre el estado y las condiciones fisicoquímicas del suelo (Aon y Colaneri, 2001; García *et al.*, 2003). De esta forma, los cambios provocados en la actividad de estas no solo dependen de las variaciones de la expresión génica, sino también de factores ambientales que afectan a la actividad (Nanniperi *et al.*, 2002).

La actividad enzimática en el suelo está asociada a factores bióticos y abióticos. Las enzimas pueden encontrarse intracelularmente en células vivas (proliferantes y latentes), muertas o en descomposición, pero asimismo pueden formar temporalmente complejos enzima-sustrato, ser adsorbidas por arcillas, estar asociadas con compuestos húmicos o bien pasar a la solución del suelo (lisis celular, por ejemplo) pudiendo cambiar su ubicación (Burns, 1982).

La fuente más importante de síntesis de enzimas corresponde a los microorganismos del suelo (Burns, 1978) y se cree además que enzimas como, por ejemplo, las esterasas son sintetizadas principalmente por bacterias y hongos. Por lo tanto, si el flujo de energía pasa a través de la microflora y los microorganismos heterótrofos son predominantes, la actividad esterasa estaría estrechamente relacionada con la actividad microbiológica total del suelo (Adam y Duncan, 2001; Green, Stott y Diack, 2006).

Las proteasas catalizan las reacciones que degradan proteínas y péptidos (Nanniperi *et al.*, 1994) y están involucradas en el ciclo del nitrógeno, al igual que ureasas y reductasas. Las lipasas son un grupo de enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en animales, en plantas como en microorganismos, y su función es catalizar la hidrólisis de los enlaces ésteres formados entre un ácido y un alcohol (Ro *et al.*, 2004).

El diacetato de fluoresceína (FDA) se puede utilizar para medir la actividad microbiana en suelos (Brunius, 1980; Lundgren, 1981; Schnürer y Rosswall, 1982), pues es degradado por numerosas enzimas, tales como proteasas, lipasas y esterasas, generando un producto cuantificable (fluoresceína). Por lo tanto, su hidrólisis se considera como un indicador general o de amplio espectro de la actividad biológica del suelo.

Cuando un suelo es expuesto a procesos degradativos, sus propiedades biológicas son afectadas y disminuye su capacidad productiva (Sánchez *et al.*, 2011). Para Dick (1994), existen indicadores del estrés que sufre un ecosistema cuando es sometido a una perturbación y, en ese sentido, el o los indicadores funcionan como sensores que advierten los disturbios del mismo. Al respecto,

las enzimas producidas por los microorganismos pueden funcionar como indicadores de la calidad de un suelo, ya que integran información sobre el estado de la población microbiana, como también de las condiciones físico-químicas del mismo (Zornoza *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2011).

Debido a todo ello, la determinación de la actividad enzimática ha sido estudiada como un biomarcador, esto es, un indicador de diferentes condiciones de calidad de suelo (Bolton *et al.*, 1985; Alef y Nanipieri, 1995; Trasar, Leirós y Gil, 2003; Gil-Sotres *et al.*, 2005; Carpa, 2009; Ferreras *et al.*, 2009; Baležentiene, 2012). Al respecto, Hu, Wang y Zeng (2006) señalan que la actividad enzimática puede responder a cambios en el manejo de un bosque más rápidamente que otras variables de suelo, por lo que pueden ser útiles como indicadores tempranos de cambios biológicos. Estos parámetros también se utilizan para caracterizar la actividad microbiana de los suelos y son relativamente fáciles de medir por medio de métodos analíticos, además representan procesos fisiológicos importantes de los microorganismos edáficos (Gajda y Martyniuk, 2005).

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La determinación de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) consiste en cuantificar espectrofotométricamente la fluoresceína producida como resultado de la acción de enzimas microbianas presentes en el suelo.

En el suelo, la hidrólisis de la FDA puede ser realizada por diferentes organismos como las bacterias heterotróficas, los hongos, las algas y los protozoos. El resultado de esta conversión enzimática es la obtención de fluoresceína, que puede ser visualizada dentro de las células usando un microscopio de fluorescencia (Lundgren, 1981) y cuantificada a través de la fluorimetría y la espectrofotometría (Swisher y Carroll, 1980; Schnürer y Rosswall, 1982). Los autores nombrados desarrollaron un método simple, rápido y sensible para determinar la actividad microbiana total del suelo por espectrofotometría.

3.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

El objetivo es la cuantificación de la actividad hidrolítica de enzimas del suelo sobre diacetato de fluoresceína como un indicador microbiológico de calidad de suelos. La aplicación del método es considerado novedoso y relativamente rápido y de fácil aplicación.

3.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

A continuación, se detalla la lista de materiales para el desarrollo de la técnica:

- Espectrofotómetro UV-visible (celda de vidrio)
- Agitador orbital
- Balanza de precisión analítica
- Frascos de vidrio con tapa a rosca de 100 ml
- Pipetas automáticas de 10 ml, 5 ml, 1 ml
- Embudos
- Papel de filtro cualitativo
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml.

3.4. REACTIVOS

Los reactivos necesarios para la determinación de FDA son los siguientes:

- Buffer fosfato sódico 60 mM (pH 7.6)
- Solución stock FDA (2 mg ml⁻¹ disuelta en acetona)
- Acetona p.a.
- Fluoresceína sódica (para la curva patrón).

3.5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Las soluciones necesarias para la marcha son: solución indicadora de stock de FDA, buffer fosfato sódico y solución de stock de fluoresceína sódica. Se detallará la preparación de cada una a continuación:

- a. **Solución indicadora de stock de FDA¹ (2 mg ml⁻¹) para agregar a la muestra problema.** En un matraz de 10 ml colocar 0,02 g de fluoresceína diacetato, disolver con acetona y enrasar.

1. Preparar preferentemente en el momento de utilizar en cantidad necesaria. Se puede conservar en freezer a -20 °C (al estar diluido en acetona no se congela).

- b. **Buffer fosfato sódico 60 mM pH 7,6²**. Solución A Fosfato monosódico (NaH_2PO_4 0,2 M): 1,19 g de NaH_2PO_4 en 50 ml. Solución B Fosfato disódico (Na_2HPO_4 0,2 M): 7,1 g de Na_2HPO_4 en 250 ml.

El buffer se obtiene con la siguiente mezcla: 32,5 ml de Solución A + 217,5 ml de Solución B, aforar a 500 ml con agua destilada (controlar que el pH esté a 7,6).

En caso de ser necesario, corregir el pH con hidróxido de sodio (en caso de tener que aumentar) o ácido fosfórico (en caso de que haya que disminuir).

- c. **Solución indicadora de stock de fluoresceína sódica (para la curva patrón)**. En un matraz aforado de 50 ml, pesar 0,010 g de fluoresceína sódica, colocar 10 ml de acetona y llevar a 50 ml con la solución buffer (0,2 mg ml⁻¹ o 602 μM).

3.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se detallan los pasos a seguir para una correcta limpieza del material a utilizar.

1. Lavar el material de vidrio y plástico con cepillo, cuidando que no queden residuos de ningún tipo.
2. Lavar con una solución de HCl (4 ml de HCl por cada 3 litros de agua).
3. Enjuagar con agua corriente 3 veces.
4. Enjuagar con agua destilada (2 o 3 veces aproximadamente).
5. Separar el material a utilizar para la determinación (en la medida de las posibilidades).

3.7. PROCEDIMIENTO

Los pasos para desarrollar la técnica se detallan a continuación:

3.7.1. Curva patrón

La curva patrón es una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utiliza para determinar la cantidad de esa sustancia presente en una muestra problema.

2. El buffer puede reservarse en heladera por una semana. Cada vez que se prepara el mismo deberá realizarse la correspondiente curva patrón. La cantidad que se pesa de cada droga dependerá del PM de la misma, que puede variar entre las distintas marcas y laboratorios (chequear cantidad necesaria para preparar la solución 0,2 M).

La realización de la misma tiene los siguientes pasos:

1. Utilizar 6 matraces de 50 ml.
2. Realizar las diluciones a partir de la solución de stock de fluoresceína sódica (en los matraces) en las diferentes proporciones, como se indica en la Tabla N° 1.
3. Colocar la alícuota de solución de stock de fluoresceína sódica correspondiente en cada matraz y enrasar con la solución buffer de fosfato sódico 60 mM.
4. Aforar y homogeneizar bien las soluciones.
5. Trasvasar a un vaso de precipitado.
6. Agregar 2,5 ml de acetona.
7. Mezclar bien.
8. Medir absorbancia a 490 nm.

Tabla N° 1. Preparación de las diluciones para la curva

<u>ml de solución stock de fluoresceína sódica</u>	<u>ml de solución Buffer fosfato sódico 60 mM</u>	<u>µg de fluoresceína (concentración de fluoresceína)</u>
0,0	50,00	0,00
0,15	49,85	30
0,3	49,70	60
0,5	49,50	100
1,0	49,00	200
1,5	48,50	300
2,5	47,50	500
3,0	47,00	600

3.7.2. Determinación en muestras

La actividad hidrolítica se determina en suelo midiendo la fluoresceína liberada luego de la acción de las enzimas hidrolíticas de la muestra problema sobre el diacetato de fluoresceína agregado. Se detalla la marcha y se indican los pasos a seguir.

1. Pesar 1 g de suelo seco³ (muestra problema). Realizar por triplicado cada muestra.
2. Añadir a cada frasco 10 ml de buffer fosfato sódico 60 mM, pH 7,6.



Figura N° 1. Diluciones de la curva patrón.

3. El secado del suelo debe ser a temperatura ambiente.

3. Agregar 0,1 ml de solución indicadora de stock de FDA (2 mgml⁻¹) y mezclar.
4. Es importante realizar un blanco para llevar el espectrofotómetro a 0, consiste en los 10 ml de buffer Na₃PO₄ 60 mM y 0,1 ml de diacetato de fluoresceína (2 mg ml⁻¹), sin suelo.
5. Incubar a 25 °C durante 2 h con agitación (100-120 rpm).
6. Agregar 10 ml de acetona para detener la reacción (al blanco también agregar acetona).
7. Filtrar con papel de filtro cualitativo y reservar el filtrado.
8. Medir la absorbancia a λ 490 nm.



Figura N° 2. Muestras de suelo con diacetato de fluoresceína.

3.8. CÁLCULOS

La reacción de la fluoresceína en el suelo se extrapola a partir de las concentraciones de referencia de la curva patrón.

El cálculo a partir de la curva patrón en la gráfica de la curva: en el eje Y, la absorbancia y en el eje X, la concentración (µg fluoresceína). La regresión lineal ajusta a la ecuación:

$$y = a \cdot x + /- b$$

Entonces, se despeja de la fórmula:

$$\mu\text{g fluoresceína (x)} = (y/a) + /- b$$

Siendo: a la pendiente, b la ordenada, y el valor de la absorbancia leída y x los µg.

Los resultados se expresan en µg de fluoresceína gss⁻¹ h⁻¹ (microgramos de fluoresceína producida/gramo de suelo seco/hora)⁴, promediando los resultados de las 3 repeticiones.

Por lo tanto, se debe dividir en 2 (son 2 h de reacción enzimática a 25°). Para ello, se realiza el siguiente cálculo:

$$\mu\text{g fluoresceína gss}^{-1} \text{ h}^{-1} = \mu\text{g fluoresceína}/2$$

En resumen. Esta metodología resulta rápida y sensible a la hora de evaluar un indicador microbiológico de suelos, sus condiciones de uso y el manejo del mismo.



Figura N° 3. Filtrado del suelo.

4. Si se cambia el peso de la muestra problema en la determinación, ajustar la fórmula para 1 g de suelo seco, para mantener la expresión de µg de fluoresceína gss⁻¹h⁻¹.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G. y Duncan, H. (2001). «Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils». *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 943-951.
- AGUILERA, M., Borie, G., Rokov, P. y Peirano, P. (1988). «Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. VII Determinación de deshidrogenasas». *Agricultura Técnica* (Chile), 48(2), 147-151.
- ALEF, K. y Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. EE.UU.: Academic Press Limited.
- AON, M.A., Cabello, M.N., Sarena, D.E., Colaneri, A.C., Franco, M.G., Burgos, J.L. y Cortassa, S.I. (2001). «Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil». *Applied Soil Ecology*, 18, 239-254.
- BALÉŽENTIENĖ, L. (2012). «Hydrolases Related to C and N Cycles and Soil Fertility Amendment: Responses to Different Management Styles of Agro-Ecosystems». *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(5), 1153-1159.
- BOLTON, J.R., Elliot, L.F., Papendick, R.I. y Bezdicsek, D.F. (1985). «Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effect of fertilization and cropping practices». *Soil Biology and Biochemistry*, 17, 297-302.
- BRUNIUS, G. (1980). «Technical aspects of the use of 3,6-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria». *Current Microbiology*, 4, 321-323.
- BURNS, R. (1978). *Soil enzymes*. Londres, Reino Unido: Academic Press.
- ____ (1982). «Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology». *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 423-427.
- CARPA, R. (2009). «Enzymological research on soils from different environments». *Annals of RSCB*, 16(1), 44-48.
- DICK, A. y Tabatabai M.A. (1992). «Significance and Potential Use of Soil Enzymes». En Meeting, F.J.B. (ed.) *Soil Microbial Ecology: Applications in Agriculture and Environmental Management* (pp. 95-127). Nueva York, EE.UU.: Marcel Dekker.
- DICK, R.P. (1994). «Soil enzyme activities as indicators of soil quality». En Doran, J. W., Coleman, D.C., Bezdicsek, D.F. y Stewart, B.A. (eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Madison, Wisconsin: ASA, Soil Science Society of America.
- FERRERAS, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V. y Beltrán, C. (2009). «Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos». *Ci. Suelo* (Argentina), 27(1), 103-114.

- GAJDA, A. y Martyniuk, S. (2005). «Microbial Biomass C and N and Activity of Enzymes in Soil under Winter Wheat Grown in Different Crop Management Systems». *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(2), 159-163.
- GARCÍA, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos. Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Editorial Mundi-prensa.
- GIL-SOTRES, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C. y Seoane, S. (2005). «Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties». *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 877-887.
- GREEN, V., Stott, D. y Diack, M. (2006). «Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples». *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 693-70.
- HU, Y.L., Wang, S.L. y Zeng, D.H. (2006). «Effects of Single Chinese Fir and Mixed Leaf Litters on Soil Chemical, Microbial Properties and Soil Enzyme Activities». *Plant and Soil*, 282(1-2), 379-386.
- LUNDGREN, B. (1981). «Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil». *Oikos*, 36, 17-22.
- NANNIPIERI, P. (1994). «The potential use of enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution». En Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta V.V.S.R y Grace, P.R. (eds.) *Soil Biota- Management in Sustainable Farming Systems* (pp. 238-244). East Melbourne, Australia: CSIRO.
- NANNIPIERI, P. y Landi, L. (2000). «Soil enzymes». En Sumner, M. (ed.) *Handbook soil science* (pp. 129-135). Boca Ratón, EE.UU.: CRC Press.
- NANNIPIERI, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. y Renella, G. (2003). «Microbial Diversity and soil functions». *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- NANNIPIERI, P., Kandeler, E. y Ruggiero, P. (2002). «Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil». En Burns, R. y Dick, R. (eds.) *Enzymes in the environment* (pp. 1-33). Nueva York, EE.UU.: CRC Press.
- RO, H.S., Hong, H.P., Kho, B.H., Kim, S. y Chung, B.H. (2004). «Genome-wide cloning and characterization of microbial esterases». *FEMS Microbiology Letters*, 233, 97-105.
- SÁNCHEZ, C., Musante, C., Benintende, M. y Benintende, S. (2011). «Actividades enzimáticas B-glucosidasa e hidrólisis de diacetato de fluoresceína en suelos de Entre Ríos. Efecto del secado de muestra sobre su determinación». *Revista Científica Agropecuaria*, 15(1-2), 7-16.
- SCHNÜRER, J. y Rosswall, T. (1982). «Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter». *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1256-1261.

- SWISHER, R. y Carroll, G.C. (1980). «Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces». *Microbial Ecology*, 6, 217-226.
- TRASAR, C., Leirós, M. y Gil, F. (2003). «Consideraciones generales sobre la determinación de las actividades enzimáticas del suelo». En García, C., Gil, F., Hernández, T. y Trasar, C. (eds.) *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos*. España: Mundi-prensa.
- ULLOA LARREA, G.A. (2014). *Hidrólisis de fluoresceína diacetato y actividad de las enzimas proteasa, celulasa, nitrato reductasa y ureasa del suelo en bosque prístino, sur de Chile*. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile.
- ZAHIR, A., Ateeq, M. y Arshad, M. (2001). «Soil enzymes research: A review». *Journal of Biology Sciences*, 1(5), 299-307.
- ZORNOZA, R., Guerrero, C., Mataixsolera, J., Arcenegui, V., Garciaorenes, F. y Mataix-Beneyeto, J. (2006). «Assessing air-drying and rewetting pre-treatment effect on some soil enzymes under Mediterranean conditions». *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2125-2134.

Capítulo 4. Actividad de las enzimas fosfatasas del suelo

Marcela Toledo

En el siglo XXI, la prioridad de producir mayores cantidades de alimentos para satisfacer a una población de más de 7 mil millones, con una gran tasa de crecimiento que la ONU (2019) espera sea de 2 mil millones para los próximos 30 años, se suma a la responsabilidad de producirlos bajo un paradigma de sustentabilidad y manteniendo la calidad del suelo, del agua y del aire. Es necesaria para tal finalidad una agricultura sustentable, basada en producir alimentos, manteniendo o mejorando la calidad ambiental, proveyendo recompensas económicas al sector productivo y manteniendo el tejido social de la comunidad rural. Es decir, nos enfrentamos a la imperiosa necesidad de contar con sistemas agrarios equilibrados y sostenidos en el tiempo, respetuosos del medioambiente, rentables, productivos e inclusivos¹.

El uso del suelo, por tal, provoca alteraciones en los atributos del mismo y en su funcionamiento. Los cambios producidos pueden significar la pérdida de calidad con tendencia a la degradación, la preservación de sus propiedades y funciones o un aumento de la calidad del suelo con tendencia al mejoramiento del mismo. La acción antrópica es clave, no solo en el impacto que produce con las actividades realizadas y las decisiones y políticas tomadas, sino también en el seguimiento y monitoreo de los cambios que se van produciendo. Como expresa nuestra Constitución en su artículo 41: «que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes, sin comprometer las de las generaciones futuras».

1. Agradecimiento a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (Unne) por el financiamiento de los proyectos PI 16A007 y PI 12A010.

La Soil Science Society of America considera a la calidad del suelo (CS) como la capacidad del suelo para funcionar dentro de ciertos límites naturales y antrópicos del ecosistema, sustentar la productividad vegetal y animal, mantener la calidad del agua y del aire, promover la salud de plantas, de animales y del hombre, y soportar su habitabilidad (Larson y Pierce, 1991; Doran y Parkin, 1994; Karlen *et al.*, 1997; De la Rosa, 2008).

Este es un concepto holístico que reconoce al suelo como parte de un sistema de producción diverso y dinámico, con atributos físicos, químicos y biológicos, que se puede cuantificar en escalas temporales específicas, así también reconoce los distintos roles de los suelos en los sistemas naturales y en los sistemas cultivados.

La calidad de un suelo puede impactar en la capacidad de uso de las tierras, en la sustentabilidad agronómica, en la productividad de los campos y en la calidad del aire y del agua. Los cambios en la CS deberán ser identificados y monitoreados para identificar áreas problemáticas, con el fin de asegurar la promoción de prácticas de manejo que favorezcan la productividad y sostenibilidad del sistema, y para realizar los ajustes necesarios y seguir las recomendaciones. Es decir que la determinación de la CS resulta necesaria para evaluar la sustentabilidad de los sistemas productivos y constituye una herramienta fundamental a la hora de tomar decisiones de manejo.

Autores como Wander y Bollero (1999), Dalurzo (2002), Giuffré *et al.* (2006), Villamil, Miguez y Bollero (2008), Rojas (2012) y Toledo (2014), entre otros, han evaluado la sensibilidad de distintos indicadores físicos, químicos y biológicos, y han seleccionado indicadores de calidad a través de la aplicación de técnicas estadísticas univariadas y/o multivariadas.

Los parámetros bioquímicos y biológicos pueden tener un rol fundamental como indicadores tempranos y sensibles de la degradación o de la restauración del suelo, como consecuencia de diferentes prácticas de manejo (Mijangos *et al.*, 2006). Actualmente se ha intensificado su estudio, ya que describen los principales procesos metabólicos que ocurren en el suelo y son de gran utilidad para evaluar la calidad edáfica (Ferrerías *et al.*, 2009).

Numerosas variables edáficas fueron propuestas como potenciales indicadores de calidad en una amplia escala temporal y espacial, y en diferentes sistemas de manejo por su sensibilidad para reflejar cambios. Sin embargo, unos pocos han sido probados y validados (Karlen *et al.*, 1997). Dentro de estos indicadores se destacan el carbono de la biomasa microbiana (Wander y Bollero, 1999), las actividades de las enzimas fosfatasas ácidas (Trasar-Cepeda *et al.*, 1998; Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005; Yoshioka, Sánchez de Prager y

Bolaños, 2006; Toledo *et al.*, 2015), de ureasas, glucosidasas y fosfatasa alcalinas (Trasar-Cepeda *et al.* 1998; Leirós *et al.*, 1999), la respiración del suelo (Doran y Jones, 1996; Karlen *et al.*, 1997; Wander y Bollero, 1999; Dalurzo, 2002), el carbono soluble (Giuffré *et al.*, 2006), la materia orgánica particulada (Wander y Bollero, 1999; Dalurzo, Vazquez y Toledo, 2006; Giuffré *et al.*, 2006; Galantini y Suñer, 2008) y el potencial del suelo para mineralizar nitrógeno (Leirós *et al.*, 1999; Wander y Bollero, 1999; Galvis-Spinola y Hernández-Mendoza, 2004; Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005; Toledo, 2014).

Zornoza *et al.* (2015) efectuaron una revisión acerca de cuáles eran los indicadores más utilizados a nivel mundial en estudios de sistemas forestales, agrícolas, urbanos y de cambios de uso. Concluyó que los indicadores biológicos están menos generalizados en la literatura, y que las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana son las más comúnmente utilizadas en rutinas básicas de evaluación de los sistemas agrícolas y forestales.

Las enzimas son un tipo especial de proteínas que se combinan con un sustrato específico y actúan para catalizar una reacción bioquímica, sin experimentar cambios en su estructura. En términos generales, las enzimas en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclado de nutrientes (Henríquez *et al.*, 2014).

El suelo es un sistema vivo donde las actividades bioquímicas ocurren a través de procesos enzimáticos (Tabatabai, 1994). Algunas enzimas, tales como celulasas, arilsulfatasas y fosfatasa, están relacionadas con las funciones específicas de degradación de sustratos o con la mineralización de nitrógeno (N), azufre (S) o fósforo (P) orgánico del suelo. Los ensayos de actividad enzimática del suelo actúan como indicadores potenciales de la calidad de los ecosistemas al ser operativamente prácticos, sensibles, integradores, y se los ha descrito como «huellas biológicas» por el manejo pasado del suelo y se relacionan con las labranzas y la estructura del suelo (Dick, 2000 citado por Videla y Picone, 2017). Son muchos los factores que influyen en la actividad de las enzimas del suelo: el historial del lote, el agregado de enmiendas, fertilizantes y herbicidas, el tipo de suelo, el pH, la temperatura, el contenido de nitrógeno total y de carbono orgánico, la actividad de la biota, los productos químicos industriales y los pesticidas (Kiss, Dracan-Bularda y Radulescu, 1975; Tabatabai, 1982; Dick, Breakwell y Turco, 1996; Toledo, Dalurzo y Vazquez, 2010; Medina, 2018).

4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FOSFATASAS

En el presente capítulo se describen los pasos a seguir para determinar la actividad a partir del método propuesto por Eivazi y Tabatabai (1977), descrito posteriormente por Tabatabai (1982).

La biota del suelo es tan variada como numerosa, a tal punto que, en un puñado de suelo, el número de organismos (flora y fauna) supera ampliamente el número de personas que habitan hoy en el mundo (7700 millones, Censo, 2019). Tan importante como aún poco conocido es el papel de la biota en el suelo y su impacto en la calidad ambiental.

El componente biológico es central en innumerables procesos y funciones que ocurren en el suelo, desde la descomposición de residuos orgánicos hasta el ciclo biogeoquímico de los nutrientes, la síntesis de sustancias húmicas, la fijación del nitrógeno atmosférico, la formación de la estructura del suelo, la descomposición de productos biodegradables que llegan a él, la inmovilización del nitrógeno y la desnitrificación, entre otros.

Las enzimas son catalizadores orgánicos que disminuyen la energía de activación de las reacciones metabólicas, aceleran las tasas de reacción y permiten que se produzcan a temperaturas y presiones a las que normalmente no tendrían lugar (Browman y Tabatabai, 1978). Son importantes componentes involucrados en el ciclo biogeoquímico de los nutrientes.

En el caso particular del ciclo del fósforo (P) intervienen las enzimas fosfatasas, las que hacen posible que formas orgánicas de P (fosfolípidos, fosfatos de inositol, ácidos nucleicos) sean convertidas a formas inorgánicas o minerales (ortofosfatos mono y diácidos). Conocidas como enzimas fosfatasas o fosfohidrolasas, catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos de H_3PO_4 (Nahas, 2002), son responsables de la mineralización del fósforo orgánico y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas. Naninperi *et al.* (2011) han estudiado en profundidad el rol de las enzimas fosfomonoesterasas en los suelos, las que son significativamente afectadas por el pH, la disponibilidad de P y la materia orgánica. Han sido extensamente estudiadas debido a su importancia en la mineralización del fósforo orgánico, en formas inorgánicas solubles disponibles para las plantas.

Las fosfomonoesterasas se clasifican en enzimas fosfatasas ácidas y alcalinas, y se diferencian por su pH óptimo de catálisis. Al tiempo que las ácidas son producidas por microorganismos y plantas superiores, las alcalinas son producidas principalmente por microorganismos (Speir y Ross, 1978; Tabatabai, 1994). Las

enzimas fosfatasa ácidas pueden estar presentes en suelos con valores de pH entre 4 y 6,5, mientras que las alcalinas lo hacen en un rango de 9 a 10. Sin embargo, es común que estén simultáneamente en el suelo (Trasar, Gil y Leirós, 2003). Análisis estadísticos indican que la actividad de las fosfatasa ácidas está correlacionada con los contenidos de carbono orgánico, nitrógeno total y nitrógeno potencialmente mineralizable (r : 0,78; 0,83; 0,69, respectivamente; $P < 0,05$) en la superficie de los suelos (Dalurzo, Toledo y Vazquez, 2005) y con el contenido de arcilla en superficie y en la profundidad del perfil (Tabatabai y Dick, 1979).

El fósforo total (Pt) del suelo contempla una parte inorgánica y otra orgánica. El P orgánico (Po) está asociado al contenido de la materia orgánica y, por lo tanto, es máximo en el horizonte superficial. Representa una fracción muy variable, entre 15% y 80% del P total, según sea el tipo de suelo y su composición (Picone y Zamuner, 2002), siendo la biomasa microbiana su actor central. El porcentaje de Po dependerá de la actividad biológica, la temperatura, la humedad, el pH del suelo, el grado de desarrollo del suelo y la textura. En líneas generales, tanto en áreas cálidas como templadas, cuanto más fina sea la textura, mayor será el contenido de Pt (Pellegrini, 2017). La importancia de las formas orgánicas del P en la nutrición fosfatada de las plantas en áreas tropicales ha sido demostrada en varios estudios (Beck y Sánchez, 1994; Maroko, Buresh y Smithson, 1999).

Del fósforo total del suelo, una parte se encuentra en forma soluble y está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente adsorbidos a las arcillas coloidales. Por otro lado, en las formas insolubles o fijadas, el P se encuentra principalmente como parte de minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de calcio, hierro, aluminio y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados. Además de la biomasa microbiana, el P orgánico extractable con NaHCO_3 compone la fracción orgánica lábil que estaría disponible para las plantas o microorganismos en un período corto de tiempo, del orden de días o semanas (Cross y Schlessinger, 1995 citados en Picone y Zamuner, 2002). Halm, Stewart y Halstead (1972) encontraron que el P orgánico lábil extractable con 0,5 M de NaHCO_3 se correlacionaba positivamente con la actividad de la enzima fosfatasa y la población microbiana.

En Argentina, en horizontes superiores de vertisoles y alfisoles de la provincia de Entre Ríos, el Po oscila entre el 41% y 74% del P total (Boschetti *et al.*, 2000; Pascale, Heredia y Giuffré, 2000). En suelos molisoles del sudeste de la provincia de Buenos Aires, el Po representa entre el 78% y 83% del P total (Diez *et al.*, 2000; Picone

et al., 2003) y en el sur de Misiones, en ultisoles y oxisoles, el Po posee entre el 18% y 28% del P total, respectivamente (Vazquez, Dalurzo y Lifschitz, 1998). En oxisoles prístinos bajo selva subtropical, con 4% de carbono orgánico, se han encontrado valores superiores a 880 ppm de Pt y de 4 a 6 ppm de P disponible para las plantas (Toledo, Dalurzo y Vazquez, 2007).

En resumen, el P en el suelo se presenta casi exclusivamente como ortofosfato, y todos los compuestos son derivados del ácido fosfórico (H_3PO_4). La mineralización del P orgánico (Po) depende de la actividad de las enzimas fosfatasas que participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica y pueden tener un rol fundamental como indicadores tempranos y sensibles de los cambios que ocurren en el suelo por efecto del uso de las tierras (Leirós *et al.*, 1999; Yoshioka, Sánchez de Prager y Bolaños, 2006; Toledo *et al.*, 2015). Naninperi *et al.* (2011) evaluaron la contribución de las actividades de las fosfomonoesterasas –ubicadas de manera diferente en la matriz del suelo– a la actividad enzimática medida e identificaron los inconvenientes de los ensayos o determinaciones utilizados.

4.2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método propuesto por Eivazi y Tabatabai (1977) es rápido y preciso (Tabatabai, 1994). La determinación de la actividad de la fosfatasa ácida o de la fosfatasa alcalina se basa en la medida espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado (PNF, de coloración amarilla) después de la incubación del suelo a 37 °C, con una disolución tamponada de p-nitrofenil fosfato disódico de pH 6,5 o pH 11, utilizado como sustrato (PNP incoloro), y tolueno. La actividad enzimática es expresada en mg de p-nitrofenol liberado por kg de suelo seco o en μg de p-nitrofenol g^{-1} suelo. h^{-1} y brinda información acerca del potencial del suelo para mineralizar Po.

Las temperaturas superiores a 60 °C inactivan o desnaturalizan las enzimas. Se da por sentado que la incubación a una temperatura de 37 °C no afecta la actividad-estabilidad (concentración) de las enzimas y para el caso de las enzimas fosfatasas del suelo, esta premisa fue comprobada por Tabatabai y Dick (1979).

El p-nitrofenol liberado durante la incubación por la actividad de las enzimas fosfatasas que actúan sobre el sustrato enzimático (p-nitrofenil fosfato disódico) se recoge en un medio alcalino (cloruro de calcio e hidróxido de sodio). El cloruro de calcio se utiliza para evitar interferencias de las sustancias húmicas con la dispersión de los minerales de arcilla (Eivazi y Tabatabai, 1977; Tabatabai, 1982).

La concentración de H⁺ afecta a enzimas, sustratos y cofactores, al alterar su ionización y solubilidad. Hay rangos de pH que resultan óptimos para cada enzima por fuera de los cuales su actividad disminuye (Eivazi y Tabatabai, 1977; Browman y Tabatabai, 1978). No solo existen rangos de pH, sino también de temperaturas en los que la actividad de cada enzima es óptima y, por fuera de ellos, la actividad y la capacidad catalítica se ven afectadas (Browman y Tabatabai, 1978). El uso de una solución tamponada o buffer a un pH óptimo para la actividad de la enzima permite mantener el pH deseado durante la reacción mientras dura la determinación analítica. Para fosfatasa ácida, se utiliza una solución tamponada a pH 6,5 y para fosfatasa alcalina, a pH 11. El procedimiento para su determinación es idéntico, como se verá más adelante.

Por otra parte, la adición de tolueno en la mezcla de incubación no afecta la actividad de las enzimas fosfomosterasas significativamente (Eivazi y Tabatabai, 1977). Por tratarse de un hidrocarburo de tipo aromático, es necesario utilizar máscaras protectoras, guantes y ropa de protección y, en lo posible, trabajar bajo campanas extractoras.

En los métodos espectrofotométricos se mide la intensidad de luz (energía radiante o radiación electromagnética) para determinar la concentración del analito presente en una muestra (en este caso, el p-nitrofenol liberado). Utilizando la espectrofotometría de absorción, medimos la absorbancia del analito –esto es, la luz absorbida– y esta magnitud se relaciona con la concentración del mismo sobre la base de la Ley de Lambert-Beer (Díaz *et al.*, 2010). Para transformar la lectura de absorbancia en concentración del analito, es necesario realizar primero lo que se denomina curva o gráfica de calibración. Para ello, se preparan soluciones del analito de concentración conocida, las que se utilizan para obtener el complejo coloreado. A continuación, se mide en el espectrofotómetro la absorbancia del complejo obtenido a una determinada longitud de onda para cada concentración conocida de analito.

En resumen, obtendremos una serie de pares de valores conocidos (concentración conocida de p-nitrofenol y su absorbancia correspondiente). Cuanto mayor sea la concentración de p-nitrofenol utilizada, mayor será la intensidad del color amarillo obtenido y, por lo tanto, mayor la absorbancia medida en el espectrofotómetro.

4.3. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

La determinación de la actividad de las enzimas del suelo constituye un medio para estimar el potencial de degradación o transformación de los sustratos orgánicos y cuánto y cómo llevan a cabo importantes pasos en el ciclado de nutrientes, indicando el nivel de los procesos.

En este caso, la determinación de la actividad de las enzimas fosfatasas provee un índice del potencial del suelo para mineralizar el fósforo orgánico y no la actividad misma de las enzimas, ya que las determinaciones se producen en ambientes controlados y no en las condiciones de campo que ocurren en cada caso en particular (pH, humedad del suelo, temperatura, sustrato enzimático natural, como ácidos nucleicos, entre otros).

4.4. EQUIPAMIENTO

Los elementos necesarios para detectar la actividad de las enzimas fosfatasas del suelo son los siguientes:

- Campana extractora.
- Balanza analítica de precisión.
- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Estufa de 0 a 50 °C o un incubador con control de temperatura.
- Cronómetro.
- Termómetro de 0 a 100 °C.
- Erlenmeyers de 50 ml y tapones o frascos de vidrio de 50 ml con tapa plástica a rosca, matraces, vasos de precipitado, matraz aforado de 10 ml, embudos, papel de filtro tipo Whatman N° 2 o similar, bandejas plásticas.

4.5. REACTIVOS DE CALIDAD PROANÁLISIS

Los reactivos necesarios son los siguientes:

- Tolueno.
- Solución MUB a pH 6,5 (Modified universal buffer pH 6,5): solución buffer o solución tampón modificada a pH 6,5 (para fosfatasas ácidas) de p-nitrofenil fosfato de sodio.
- Solución PNP: solución de p-nitrofenil fosfato 0,05 M.
- Solución estándar de p-nitrophenol.

- Cloruro de calcio 0,5 M.
- Hidróxido de sodio 0,5 M.

4.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Los pasos a seguir para acondicionar el material disponible son los siguientes:

4.6.1. Toma y acondicionamiento de muestras de suelo

Un axioma de Jackson (1964) expresa que «un análisis no puede ser mejor que la muestra». Generalmente, este factor es menospreciado, tanto a nivel de campo como de laboratorio, cuando en realidad es una parte fundamental del resultado que se obtenga.

En general, el muestreo para determinar parámetros biológicos requiere de consideraciones especiales debido a la dinámica misma de los procesos biológicos que ocurren en los suelos. Principalmente, es importante la época del año en que se extraen las muestras, pues las estaciones del año definen las temperaturas y precipitaciones, y estas varían con la ubicación geográfica y el clima de cada lugar. Si se van a tomar varias muestras durante el año, es recomendable que las mismas se distribuyan a lo largo de las estaciones. Si solamente se va a efectuar el muestreo una vez en el año, se recomienda hacerlo durante la estación en que las condiciones de temperatura y humedad del suelo se encuentran más estables y lejos de disturbios (Dick, Breakwell y Turco, 1996).

Sugiero que el muestreo se realice durante los meses de otoño para la región del Nordeste argentino y alejado de disturbios importantes, como las labranzas, el encalado, la incorporación de rastrojos o el agregado de enmiendas orgánicas, entre otros, ya que pueden alterar momentáneamente la actividad enzimática y no representar el comportamiento del sistema a largo plazo. Para estudios con fines de fertilidad, al ser el P un elemento poco móvil y presentar en general alta variabilidad, es importante tomar un número suficiente de muestras compuestas de suelo de 0 a 0,10 m y de 0,10 a 0,20 m de profundidad y transportarlas lo más rápidamente al laboratorio, sin dejarlas expuestas al sol.

Una vez en el laboratorio, si las muestras serán analizadas en el corto plazo, se las debe acondicionar distribuyéndolas en bandejas plásticas y dejando que se sequen al aire, a fin de homogenizar el estado de humedad de las mismas, en equilibrio con la humedad del ambiente. En caso de que las determinaciones analíticas se realicen más adelante, se recomienda conservar las muestras de suelo a 4 °C con la humedad de campo hasta el momento de

utilizarlas. No obstante, también puede optarse por secarlas al aire y luego colocarlas a 4 °C, ya que Baligar, Wright y Smedley (1988) encontraron que la actividad medida en muestras húmedas o secas al aire conservadas a 4 °C presentan alta correlación.

El secado al aire puede afectar la actividad de las enzimas. Según sea el tipo de enzimas, la estabilidad puede disminuir en algunas y en muchas otras mantenerla sin cambios durante varias semanas e incluso meses hasta el análisis (Dick, Breakwell y Turco, 1996). Con respecto a este punto, estudios previos realizados por algunos autores demostraron que la actividad enzimática no se afectó por el tratamiento de secado al aire en comparación con el uso de la muestra con la humedad de campo (Henríquez *et al.*, 2014). En cuanto a la acción de la luz, estudios previos realizados por la autora demostraron que la actividad enzimática no se vio afectada cuando la determinación se realizó en ausencia de luz, en comparación con la presencia de luz en el laboratorio (datos no publicados).

Una vez secas al aire, las muestras deben ser molidas con mortero y pilón de porcelana o con molinillo de suelos, luego pasadas por un tamiz de malla de 2 mm (N° 10) y de esta manera se obtiene la llamada «tierra fina» a partir de la que se procede a realizar el análisis.

4.7. PROCEDIMIENTO

Para una mayor precisión, las mediciones siempre se deben realizar por triplicado².

2. Algunas consideraciones. La curva de calibración deberá realizarse cada nuevo día en que se realicen lecturas, ya que los factores sufrirán variaciones conforme al estado de las soluciones y a factores ambientales. En caso de utilizar una estufa, calibrar la temperatura en 37 °C al menos 24 horas antes de incubar y controlar repetidas veces con termómetro extra para asegurar que se haya llegado a una temperatura equilibrada. La alícuota a tomar del filtrado obtenido en el paso 3 varía con los suelos y la actividad enzimática que presenten. Normalmente con 1 o 2 ml es suficiente, pero puede suceder que se requiera una alícuota mayor si la actividad es más bien baja o diluciones si es muy alta. Conservar las soluciones de PNP y MUB en heladera, en matraces tapados. En el paso 3, una vez adicionados el CaCl₂ y el NaOH, es importante filtrar inmediatamente para evitar precipitados. De ser necesario, se puede centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos antes de efectuar la lectura en absorbancia. En ensayos donde el tiempo de incubación es corto, el agregado de tolueno (inhibidor microbiano) detiene la síntesis de enzimas por las células vivas y previene las reacciones de asimilación de productos (Tabatabai, 1982).

1. En un Erlenmeyer de 50 ml, colocar 1 g de «tierra fina», agregar 0,2 ml de tolueno (añadido gota a gota a las paredes de vidrio), 4 ml de solución MUB y 1 ml de solución PNP. Mover suavemente el Erlenmeyer en círculos durante unos segundos para facilitar la mezcla de contenidos y cerrar con tapón.
2. Llevar a incubación durante 1 hora a 37 °C. Al cabo de ese tiempo, retirar de la estufa o incubadora, colocar bajo campana extractora, dejar enfriar y luego destapar.
3. Adicionar 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M. Nuevamente mover suavemente el Erlenmeyer en círculos durante unos segundos y filtrar la suspensión resultante utilizando papel Whatman N° 2 o similar. Recoger el filtrado.
4. Colocar una alícuota (1 o 2 ml) del filtrado en un matraz aforado de 10 ml y llevar a volumen con agua destilada a 10 ml finales, mezclar suavemente y proceder a la cuantificación del p-nitrofenol liberado –manifiesto en la intensidad del color amarillo– utilizando un espectrofotómetro o fotocolorímetro. Efectuar la lectura en absorbancia a una longitud de onda de 410 nm, previa calibración del equipo. Si la intensidad del color amarillo desarrollado excede la del patrón de 50 µg de p-nitrofenol, deberán efectuarse las diluciones que sean necesarias, tomando una alícuota del filtrado y agregando agua destilada hasta que la lectura realizada en el fotocolorímetro entre en la escala de calibración.
5. Calcular el p-nitrofenol contenido en el filtrado a partir de los niveles de referencia graficados en la curva de calibración, correspondiente a lecturas obtenidas de los estándares que contienen 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg de p-nitrofenol.
6. Realizar un control o blanco de reacción por cada muestra de suelo analizada siguiendo los pasos 1, 2 y 3, excepto que el agregado de 1 ml de PNP (sustrato) para el caso del control deberá hacerse después del agregado del CaCl_2 y del NaOH e inmediatamente antes del filtrado. Es decir que, en el caso del control, el sustrato enzimático se agrega solo después de la incubación. El control debe realizarse con cada suelo analizado para detectar el color que no deriva del p-nitrofenol liberado por la actividad de la fosfatasa. De manera que, a la lectura de absorbancia de cada muestra de suelo analizada, se le deberá restar la de su respectivo control. Posteriormente, el valor de absorbancia así obtenido (L) se interpola en una curva de calibración para obtener finalmente el valor de la actividad enzimática o se aplica la formulación detallada en este capítulo.

7. Obtener una gráfica de calibración para realizar los estándares arriba mencionados. En un matraz aforado de 100 ml, preparar una solución estándar diluida (SED) de la siguiente manera: colocar 1 ml de solución estándar de p-nitrofenol, diluir hasta 100 y enrasar. Tapar el matraz y agitar suavemente durante unos segundos para permitir la mezcla homogénea de la solución. A continuación, construir los patrones o estándares tomando alícuotas 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la solución estándar diluida (SED) y colocarlos en Erlenmeyers de 50 ml, agregar agua destilada en cantidad necesaria hasta completar en cada caso los 5 ml finales. Luego, agregar 1 ml de CaCl_2 0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M, agitar suavemente unos segundos, filtrar con papel Whatman N° 2 o similar y recoger el filtrado. En los filtrados realizar las lecturas utilizando el espectrofotómetro o fotocolorímetro en absorbancia a 410 nm y construir la gráfica correspondiente con las lecturas de los patrones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de p-nitrofenol.

4.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se deben preparar las siguientes soluciones:

- a. **Solución Buffer Universal (MUB) Stock.** Reactivos: Na (OH) 1 M, Tham, Tris (hidroximetil) aminometano, ácido maleico, ácido cítrico, ácido bórico. En un matraz aforado de 250 ml, disolver 3,025 g de Tham, 2,9 g de ácido maleico, 3,5 g de ácido cítrico y 1,575 g de ácido bórico en 122 ml de Na (OH) 1 M. Llevar a volumen con agua destilada hasta completar 250 ml. Guardar en un refrigerador.
- b. **Solución Buffer Universal (MUB) a pH 6,5 (para Enzimas Fosfatasas Ácidas).** En un vaso de precipitado de 500 ml, colocar 200 ml de la Solución Buffer Universal (MUB) Stock. Mediante el uso de HCl 0, 1 N y de un agitador magnético, valorar el pH de la solución hasta 6,5. Trasvasar a un matraz aforado de 1 litro y llevar a volumen con agua destilada. Guardar en un refrigerador. Para determinar la actividad de las *enzimas fosfatasas alcalinas*, se emplea la misma metodología aquí descrita, pero cambiando el pH, mediante el uso de una *Solución Buffer Universal (MUB) a pH 11*. Para elevar el pH, se recomienda emplear hidróxido de sodio 0,1 M.

- c. **Solución estándar de p-nitrofenol.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 0,25 g de p-nitrofenol en aproximadamente 20 a 30 ml de agua destilada, luego llevar a volumen hasta 250 ml con agua destilada. Guardar en un refrigerador.
- d. **Solución de p-nitrofenil fosfato disódico (PNP) 0,05 M.** En un matraz aforado de 50 ml, disolver 0,84 g de disodios para nitrofenil fosfato tetrahidrato en 40 ml de MUB pH 6,5 (para fosfatasa ácida), llevar a volumen y enrasar a 50 ml con la misma solución. Conservar en heladera y proteger de la acción de la luz, para lo cual se recomienda colocar el matraz dentro de una bolsita plástica negra o en un frasco caramelo. *Observaciones:* la solución PNP es incolora. Se utiliza como sustrato enzimático y puede ser empleada en una concentración de 0,05 M, como en este caso (Dick, Breakwell y Turco, 1996), pero también en una concentración de 0,025 M (Tabatabai, 1982). Las soluciones de los sustratos usados para el ensayo de fosfomonoesterasas y fosfodiesterasas son estables durante varios días si se almacenan en un refrigerador (Tabatabai, 1994). Una vez abierto el disodios para nitrofenil fosfato tetrahidrato, es conveniente conservarlo a ≤ 4 °C. Existe la posibilidad de aplicar esta metodología aquí descrita, obviando el uso de tolueno (Tabatabai, 1994; Effron *et al.*, 2006; Medina, 2018).
- e. **Cloruro de calcio 0,5 M.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 18,375 g de $\text{Cl}_2 \text{Ca} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, en 175 ml de agua destilada y luego continuar agregando agua hasta llevar a volumen final de 250 ml.
- f. **Hidróxido de sodio 0,5 M.** En un matraz aforado de 250 ml, disolver 5 g de hidróxido de sodio en 175 ml de agua destilada y luego llevar a volumen final de 250 ml. La reacción es exotérmica, por cuanto es importante trabajar con material tipo Pyrex y siempre apoyando el matraz previamente sobre un paño o una placa atérmica.

4.9. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se calcula la cantidad de p-nitrofenol liberado durante la incubación y contenido en los filtrados, utilizando la curva de calibración construida con cantidades conocidas de p-nitrofenol.

Para el cálculo de la actividad de la fosfatasa en mg p-nitrofenol. kg⁻¹ de suelo. h⁻¹, sobre la base del contenido de p-nitrofenol liberado durante la incubación, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{mg p-nitrofenol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}=\text{L}*\text{Fc}*\text{Fd}*1000/1000$$

Donde: L es la lectura en absorbancia, Fc el factor de calibración que se obtiene promediando las lecturas de absorbancia obtenidas para los patrones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg, Fd es el factor de dilución. Consignar en caso de haber efectuado diluciones.

Como la actividad de las enzimas está operativamente definida, si las condiciones de la determinación analítica son alteradas (ejemplo: temperatura de incubación, pH solución buffer, fuerza iónica), los resultados también cambiarán (Dick, Breakwell y Turco, 1996). Por lo tanto, es muy importante respetar el protocolo de determinación cuando se quieran hacer comparaciones de la actividad de las enzimas en diferentes suelos dentro de un mismo estudio. El procedimiento descrito es estándar y está contemplado en la literatura.

En la bibliografía en general, la actividad de las enzimas está expresada por kg o g de masa de suelo, pero también puede resultar de interés expresarla en términos volumétricos o en unidades de área por profundidad de suelo para proveer una perspectiva ecológica.

Para expresar en términos volumétricos, será necesario contar con el dato de densidad aparente del suelo correspondiente a la profundidad analizada.

A continuación, se han tabulado valores encontrados en la literatura, mostrando una serie de rangos y de valores medios para la actividad enzimática de las fosfatasas que han sido obtenidos aplicando el protocolo propuesto en este capítulo. No obstante, los valores son limitados e incompletos, ya que existen diferentes ambientes y tipos de suelos, usos de suelo y prácticas de manejo, valores que no incluyen a todos. En conclusión, lo ideal es trabajar aplicando el protocolo en distintos ambientes, prácticas agronómicas y suelos, e ir calibrando los valores para cada caso, de manera que las actividades de las enzimas deben ser interpretadas con precaución y teniendo en cuenta la evaluación de otros atributos de la calidad del suelo.

Tabla N° 1. Valores medios y rangos de la actividad de las fosfatasa ácidas (APA) y de las alcalinas (APAL) obtenidos con el método aquí descripto y encontrados en la literatura

Actividad de la fosfatasa ácida (APA) mg p-nitrofenol .kg⁻¹ de suelo.h⁻¹			
	Rango	Valor medio	Procedencia
Suelo seco al aire	80 a 1112	284	USA, Australia, Dinamarca n=11 ¹
Suelo seco al aire	96 a 1039	427 (prístino) 256 (forestal-Pinus sp.) 223 (agrícola)	Suelos rojos, Misiones, Argentina Rango: n=144 Medias: n=12 ²
Suelo seco al aire	79 a 633	569 (Alfisol-suelo virgen) 561 (Vertisol-suelo virgen) 443 (Vertisol- Setaria sp.) 352 (Alfisol con pastos naturales-ex-arrocera)	Corrientes, Argentina Rango: n=10 ³
Suelo a humedad de campo	23 a 2100	617	EE. UU., N. Zelanda y Europa n=46 ⁴

¹ Dick, Breakwell y Turco (1996). ² Toledo (2014).

³ Arzuaga *et al.* (2005). ⁴ Dick, Breakwell y Turco (1996).

Tabla N° 2. Valores medios y rangos de actividad de las fosfatasa alcalinas (APAL) obtenidos con el método aquí descripto y encontrados en la literatura

Actividad de la fosfatasa alcalina (APAL) mg p-nitrofenol .kg⁻¹ de suelo. h⁻¹			
	Rango	Valor medio	Procedencia
Suelo seco al aire	18 a 381	144	EE. UU., n=11 ¹
Suelo a humedad de campo	11 a 1000	122	EE. UU., n=17 ²

¹ Dick, Breakwell y Turco (1996). ² Dick, Breakwell y Turco (1996).

Tabla N° 3. Valores medios de la actividad de las fosfatasas ácidas (APA) obtenidos en superficie para suelos de Argentina al aplicar PNP como sustrato enzimático

Uso	APA (mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹ ó µg p-nitrofenol. g ⁻¹ .h ⁻¹)	Orden de suelo y procedencia
Selva paranaense	698	Oxisol (Pcia. Misiones) ¹
Agrícola-Cultivo de Tabaco	275	Oxisol (Pcia. Misiones) ²
Agrícola-Citrus	270	Oxisol (Pcia. Misiones) ³
Agrícola-Arroz	437	Alfisol (Pcia. Corrientes) ⁴
Agrícola-Citrus	151	Entisol (Pcia. Corrientes) ⁵
Forestaciones con quebracho colorado chaqueño	255	Alfisol (Pcia. del Chaco) ⁶
Agrícola-Yerba mate	251	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁷
Selva subtropical	671	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁸
Agrícola-Cultivo de Té	197	Oxisol (Pcia. Misiones) ⁹
Agrícola-Maíz monocultivo	249	Oxisol (Pcia. Misiones) ¹⁰
Monte-Urunday y Guayacán	≈800	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹¹
Monte-Espina corona	≈1000	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹²
Monte-Mora	≈1300	Molisol (Pcia. del Chaco) ¹³
Suelo de referencia	598	Molisol (Marcos Juárez, Córdoba) ¹⁴
Agrícola-Soja-siembra directa-con cultivo de cobertura	567	Molisol (Marcos Juárez, Córdoba) ¹⁵
Agrícola-Soja con distintas rotaciones y secuencias trigo, maíz	510 a 541	Molisol (Rafaela, Santa Fe) ¹⁶
Agrícola-Soja-Soja	346	Molisol (Oliveros, Pcia. de Santa Fe) ¹⁷
Agrícola-Soja	38 a 105	No específica. Pergamino (Pcia. Bs. As.) ¹⁸

Agrícola-Soja	27 a 41	No específica. Manfredi (Pcia. Córdoba) ¹⁹
Forestal-Roble	≈1400	Andisol (Pcia. de Chubut) ²⁰
Forestal-Fresno	≈1200	
Forestal-Pino radiata	≈600	
Ganadero-Gramíneas nativas	≈2,8 a 3,8 (μmol p-nitrofenol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Aridisol (Sur pcia. de Bs. As.) ²¹
Agrícola-cultivo de Vid-manejo convencional	≈10 (μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹)	No específica (Pcia. San Juan) ²²
Agrícola-cultivo de Vid-manejo orgánico	≈30 a 32 (μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹)	No específica (Pcia. San Juan) ²³

¹ Toledo, Dalurzo y Vazquez (2010). ² Toledo, Dalurzo y Vazquez (2010). ³ Dalurzo, Toledo y Vazquez (2005). ⁴ Arzuaga *et al.* (2005). ⁵ Arzuaga *et al.* (2005). ⁶ Arzuaga *et al.* (2007). ⁷ Toledo *et al.* (2015). ⁸ Arzuaga (2016). ⁹ Arzuaga (2016). ¹⁰ Toledo (2014). ¹¹ Effron *et al.* (2006). ¹² Effron *et al.* (2006). ¹³ Effron *et al.* (2006). ¹⁴ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁵ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁶ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁷ Ferreras *et al.* (2009). ¹⁸ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ¹⁹ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ²⁰ Effron *et al.* (2012). ²¹ Ambrosino *et al.* (2020). ²² Medina (2018). ²³ Medina (2018).

Tabla N° 4. Valores medios de la actividad de la fosfatasa alcalina (APAL) obtenidos en superficie para suelos de Argentina al aplicar PNP como sustrato enzimático

Uso	APAL	Orden de suelo y procedencia
Agrícola-Soja	5,7 - 13,8 mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹	No específica. Pergamino (Bs. As.) ¹
Agrícola-Soja	8,2 - 15,5 mg p-nitrofenol. kg ⁻¹ suelo .h ⁻¹	No específica. Manfredi (Córdoba) ²
Ganadero-Gramíneas perennes nativas	≈1,5 a 1,9 μmol p-nitrofenol.g ⁻¹ .h ⁻¹	Aridisol ³
Agrícola-cultivo de Vid-manejo convencional	≈25 μg p-nitrofenol. g ⁻¹ . mL ⁻¹	No específica. Dpto. San Martín (Pcia. San Juan) ⁴

≈: aproximado sobre la base de gráficos visualizados en los trabajos originales publicados.

¹ Fernández, Sagardoy y Gómez (2008). ² Fernández, Sagardoy y Gómez (2008).

³ Ambrosino *et al.* (2020). ⁴ Medina (2018). ⁵ Medina (2018).

En resumen. Las enzimas fosfatasa ácidas y alcalinas son importantes indicadores de la calidad biológica. Es menester respetar los protocolos definidos para su determinación y los resultados deben ser interpretados con precaución, teniendo en cuenta la evaluación de otros atributos de la calidad del suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSINO, M.L., Lucero, C.T., Pagliero, F.E., Lorda, G.S., Ithurrart, L.S., Torres, Y.A., Blázquez, F.R. *et al.* (2020, octubre 13-16). Actividad enzimática celulosa y fosfatasa del suelo luego de una quema controlada en un pastizal semiárido [Actas]. *XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. «Suelos: desafíos para una producción y desarrollo sustentables». Corrientes, Corrientes, Argentina, pp. 333-338.
- ARZUAGA, S.A., Fernández López, C., Dalurzo, H.C. y Vazquez, S. (2005). «Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa ácida». En *Entisoles, alfisoles y vertisoles de Corrientes con diferentes usos agrícolas*. Corrientes: Comunicaciones científicas y tecnológicas, Secretaría General de Ciencia y Técnica, Unne.
- ARZUAGA, S.A., Morales, L.A., Prause, J. y Toledo, D.M. (2007, agosto 3-6). «Fósforo asimilable y fosfatasa ácidas en suelos forestados con Quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae engler*) en la provincia del Chaco» [Actas]. *XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la Facultad de Ciencias Agrarias-Unne*. Corrientes.
- ARZUAGA, S.A., Toledo, D.M., Contreras Leiva, S.M., Lamon, F. y Vazquez, S. (2016). «Efecto de sustitución de la selva por forestaciones y cultivos agrícolas sobre la actividad enzimática» [Actas]. *XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo*. Río Cuarto, Córdoba. Disponible en <https://bit.ly/3ttQzOg>
- BALIGAR, V.C., Wright, R.J. y Smedley, M.D. (1988). «Acid phosphatase activity in soil of the Appalachian Region». *Soil Science Society of American Journal*, 52, 1612-1616.
- BECK, M.A. y Sánchez, P.A. (1994). «Soil phosphorus fraction dynamics during 18 years of cultivation on a Typic Paleudult». *Soil Science Society of American Journal*, 58, 1424-1431.
- BOSCHETTI, N.G., Valenti, R., Vesco, C. y Sione, M. (2000). «Contenido de fósforo total en suelos con características vérticas de la provincia de Entre Ríos». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20, 53-58.

- BROWMAN, M.G. y Tabatabai, M.A. (1978). «Phosphodiesterase activity of soils». *Soil Science Society of American Journal*, 42, 284-290.
- DALURZO, H.C. (2002). *Agregado de residuos orgánicos en suelos ferralíticos. Efecto sobre variables que estiman sustentabilidad*. Tesis Magister Scientiae. Buenos Aires: Escuela para Graduados Alberto Soriano, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- DALURZO, H.C., Toledo D.M. y Vazquez, S. (2005). «Parámetros químicos y biológicos en Oxisoles con uso citrícola». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 23(2), 159-165.
- DALURZO, H.C., Vazquez, S. y Toledo, D.M. (2006). «Calidad de suelos en agroecosistemas de Misiones». En Paz González, A. (ed.) *Bases para la conservación de suelos y aguas en la Cuenca del río Paraná* (pp. 109-117). España: Xunta de Galicia.
- DE LA ROSA, D. (2008). *Evaluación agro-ecológica de los suelos para un desarrollo rural sostenible*. Buenos Aires: Mundi-prensa.
- DÍAZ, n.A., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A. y Jorrín Novo, J. et al. (2010). *Espectrofometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba, España: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Disponible en <https://bit.ly/3uiMWKj>
- DICK, R.P., Breakwell, D.P. y Turco, R.F. (1996). «Soil Enzyme Activities and Biodiversity Measurements as Integrative Microbiological Indicators». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Methods for Assessing Soil Quality*. Vol. 49. Cap. 15. Especial publication. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- DIEZ, A., Zamuner, E., Picone, L. y Berardo, A. (2000). «Efecto de la aplicación de dosis única o fraccionada de fertilizante fosfatado sobre el fósforo del suelo» [Actas]. *XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. AACs. Mar del Plata, Buenos Aires.
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assesing soil quality». En Doran, J.W. et al. (eds.) *Defining soil quality for sustaninable environment* (pp. 3-21). Spec. Publ. 35. Madison. Wisconsin: Soil Science Society of America y ASA.
- DORAN, J.W. y Jones, A. (1996). *Methods for assessing soil quality*. SSSA Special Publ. 49. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- EIVAZI, F. y Tabatabai, M.A. (1977). «Phosphatases in soils». *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 9, Issue 3, 167-172.
- EFFRON, D.N., Jimenez, M.P, Defrieri, R.L. y Prause, J. (2006). «Relación de la actividad de fosfatasa ácida con especies forestales dominantes y con algunas propiedades del suelo de un bosque argentino». *Información Tecnológica*, 17(1), 3-7.
- EFFRON, D.N., Sarti, G.C., Quinteros, M.C. y Catán, S.I. (2012). «Influencia de Especies Arbóreas Implantadas sobre Parámetros Biológicos y

- Bioquímicos en un Suelo Forestal de Chubut, Argentina». *Información Tecnológica*, 23(2), 87-92.
- FERNÁNDEZ, L.A., Sagardoy, M.A. y Gómez, M.A. (2008). «Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la Región Pampeana Norte del área sojera argentina». *Revista Ciencia del suelo*, 26(1), 35-40.
- FERRERAS, L., Toresani, S., Bonel, B., Fernández, E., Bacigaluppo, S., Faggioli, V. y Beltrán, C. (2009). «Parámetros químicos y biológicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 27, 103-114.
- GALANTINI, J.A. y Suñer, L. (2008). «Las fracciones orgánicas del suelo: análisis en los suelos de la Argentina». *Agriscientia*, XXV, 41-55.
- GALVIS-SPINOLA, A. y Hernández-Mendoza, T. (2004). «Cálculo del nitrógeno potencialmente mineralizable». *Interciencia*, 29, 377-383.
- GIUFFRÉ, L., Romaniuk, R., Conti, M.E. y Bartoloni, N. (2006). «Multivariate evaluation of no-tillage system quality indicators in Argiudolls of Rolling Pampa (Argentina)». *Biology and Fertility Soils*, 42, 556-560.
- HALM, B.J, Stewart, J.W.B. y Halstead, R.L. (1972). «The phosphorus cycle in a native grassland ecosystem». En *Isotopes and radiation in soil-plant relationships including forestry* (pp. 571-586). Vienna: Int. Atomic Energy Agency, SM 151/7.
- HENRÍQUEZ, C., Uribe L., Valenciano, A. y Nogales, R. (2014). «Actividad enzimática del suelo -Deshidrogenasa, -glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos». *Agronomía Costarricense*, 38(1), 43-54. Disponible en www.cia.ucr.ac.cr
- JACKSON, M.L. (1964). *Análisis químico de suelos*. Barcelona: Ediciones Omega.
- KARLEN, D.L., Mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F. y Schuman, G.E. (1997). «Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation». *Soil Science Society of American Journal*, 61, 4-10.
- KISS, S., Dracan-Bularda, M. y Radulescu, D. (1975). «Biological significance of enzymes accumulated in soil». *Advances in Agronomy*, 27, 25-87.
- LARSON, W.E. y Pierce, F.J. (1991). *Conservation and enhancement of soil quality*. In *Evaluation of sustainable management in the developing world*. Vol 2 (pp. 175-203). IBSRAM Proc. 121 (2). Bangkok, Tailandia: Int. Board for soil Res. and Management.
- LEIRÓS, M.C., Trasar-Cepeda, C., García-Fernández, F. y Gil-Sotres, F. (1999). «Defining the validity of a biochemical index of soil quality». *Biology and Fertility of Soils*, 30, 140-146.
- MAROKO, J.B., Buresh, R.J. y Smithson, P.C. (1999). «Soil phosphorus fractions in unfertilized fallow-maize systems on two tropical soils». *Science Society of American Journal*, 63, 320-326.
- MEDINA, E.M. (2018). *Efectos de los diferentes manejos agronómicos sobre indicadores bioquímicos y microbiológicos de calidad de suelos*

- de viñedos. Tesis Doctoral. San Juan: Universidad Nacional de San Juan. Disponible en <https://bit.ly/3NactoW>
- MIJANGOS, I., Pérez, R., Albizu, I. y Garbisu, C. (2006). «Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters». *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 100-106.
- NAHAS, E. (2002). «Microorganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas». *Bragantia, Campinas*, 61, 267-275.
- NANNIPIERI, P., Giagnoni, L., Landi, L. y Renella G. (2011). «Role of Phosphatase Enzymes in Soil». Cap. 9. En Bunemann, E.K. *et al.* (eds.) *Phosphorus in Action, Soil Biology* (pp. 215-243). Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Organización de las Naciones Unidas (2019). *Una población en crecimiento*. Disponible en <https://bit.ly/3qrt6eO>
- PASCALÉ, C., Heredia, O. y Giuffré, L. (2000). «Distintas fracciones de P en suelos de Entre Ríos». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20, 59-62.
- PELLEGRINI, A.E. (2017). *Macronutriente del suelo: Fósforo*. La Plata: UNLP.
- PICONE, L.I. y Zamuner, E. (2002). «Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica». *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 16.
- PICONE, L.I., Zamuner, E.C., Berardo, A. y Marino, M.A. (2003). «Phosphorus transformations as affected by sampling date, fertilizer rate, and phosphorus uptake in a soil under pasture». *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 67, 225-32.
- ROJAS, J.M. (2012). *Indicadores de calidad de suelos desmontados y destinados a la producción agrícola en el área piloto de la Ecorregión chaqueña*. Maestría en Ciencias Agrarias, Orientación: Producción Sustentable. Tucumán: Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán.
- SPEIR, T.W. y Ross, D.J. (1978). «Soil phosphatase and sulphatase». En Burnes, R.G. (ed). *Soil Enzymes* (pp: 197-250). Nueva York: Academic Press.
- TABATABAI, M.A. y Dick, W.A. (1979). «Distribution and stability of phosphatase in soil». *Soil Biology and Biochemistry*, 11, 655-659.
- TABATABAI, M.A. (1982). «Soil enzymes». En Page, A.L., Miller, R.H. y Keeney, D.R. (eds.) *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties (2a ed., pp. 903-927). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.
- _____ (1994). «Soil Enzymes». En Soil Science Society of America (ed.) *Methods of Soil Analysis*. Parte 2. Microbiological and Biochemical Properties (pp. 775-833). Book series N° 5).
- TRASAR, C., Gil, F. y Leirós, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid: Mundi-prensa.

- TOLEDO, D.M., Dalurzo, H.C y Vazquez, S. (2007, septiembre 17-21). «Efecto del uso tabacalero sobre el fósforo total en Oxisoles de la República Argentina» [Actas 276]. *XVII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. León Guanajuato, México.
- _____. (2010). «Fosfatasa ácida en Oxisoles bajo cultivo de tabaco». *Revista de la Ciencia del Suelo de la Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo*, 28(1), 33-38.
- TOLEDO, D.M. (2014, septiembre). *Calidad de suelo en Agro-ecosistemas de Misiones: Desarrollo y validación de Índices de calidad. Su aplicación en la evaluación del cambio en el uso de las tierras*. Tesis para acceder a Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el área de Recursos Naturales. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste septiembre.
- TOLEDO, D.M., Arzuaga, S.A., Contreras Lieva, S.M. y Vazquez, S. (2015). «Biological indicators of soil quality in natural and cultivated subtropical systems». *Journal of Advances in Agriculture*, 4(2).
- TRASAR-CEPEDA, C., Leirós, C., Gil-Sotres, F. y Seoane, S. (1998). «Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties». *Biology and Fertility of Soils*, 26, 100-106.
- VAZQUEZ, S., Dalurzo, H. y De Lifschitz, A.P. (1998). «Distribución del fósforo total y orgánico en Alfisoles, Ultisoles y Oxisoles del sur de Misiones (Argentina)». *Ciencia del Suelo*, 16, 47-49.
- VIDELA, C. y Picone, L. (2017). «Indicadores biológicos de calidad de suelo». En Wilson, M.G. et al. (eds.) *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina* (1a ed.) Entre Ríos: Ediciones Inta.
- VILLAMIL, M.B., Miguez, F.E. y Bollero, G.A. (2008). «Multivariate Analysis and Visualization of Soil Quality Data for No-Till Systems». *Journal of Environmental Quality*, 37, 2063-2069.
- WANDER, M.M. y Bollero, G.A. (1999). «Soil Quality Assessment of Tillage Impacts in Illinois». *Science Society of American Journal*, 63, 961-971.
- YOSHIOKA, I.C., Sánchez de Prager, M. y Bolaños, M.M. (2006). *Actividad de fosfatasas ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo*. Artículo derivado de la Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en suelos. Colombia: UNAL. Disponible en <https://bit.ly/3itsig>
- ZORNOZA, R., Acosta, J., Bastida, F., Domínguez, S.G., Toledo, D.M. y Faz, A. (2015). «Identification of Sensitive Indicators to Assess the Interrelationship between Soil Quality, Management Practices and Human Health». *Soil*, 1, 173-185. Göttingen: Copernicus Editorial-European Geosciences Union.

Grupos funcionales

PARTE 3

Capítulo 1. Determinación de nitrógeno en forma de amonio a partir de la actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, José M. Recalde, Amalia M. E. Romero, Amílcar Correa, Daniela González, Mariana Ferreira y María C. Iglesias

El nitrógeno es un elemento mineral esencial para los organismos vegetales. Dada su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva, es considerado un macronutriente y, después del agua, es el nutriente más importante en el desarrollo de las plantas (Azcón Bieto y Talón, 2013).

El nitrógeno presente en el suelo proviene de la atmósfera, donde se encuentra principalmente como gas dinitrógeno (N_2). Esta molécula, de gran estabilidad debido a su alta energía de enlace, no puede ser aprovechada por la mayoría de los organismos. Ciertos procariotas, llamados diazótrofos, tienen la capacidad de romper este enlace y asimilar el N atmosférico. Esta fijación biológica de nitrógeno es un proceso de reducción en el que el gas dinitrógeno es reducido hasta amonio y rápidamente convertido en cualquier molécula nitrogenada requerida por la célula (Frioni, 2011), pasando a formar parte del nitrógeno orgánico del suelo al ser constituyente de la biomasa microbiana.

En el suelo, el ciclo del nitrógeno representa solamente una parte del ciclo total del nitrógeno en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es de gran importancia para las plantas que absorben nitratos y amonio que utilizan en la síntesis de proteínas y de otros compuestos orgánicos vegetales. Tanto el hombre como los animales aprovechan, en su nutrición, los productos nitrogenados vegetales. Cuando restos animales y vegetales vuelven al suelo, son objeto de numerosos procesos de transformación, en su mayoría de carácter biológico (Fassbender y Bornemisza, 1987).

La mineralización del nitrógeno ocurre fundamentalmente mediante dos procesos: la amonificación, proceso en el que 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 (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. 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 de 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 y neutraliza los ácidos del suelo, otra parte es inmediatamente reutilizada por múltiples microorganismos heterótrofos, 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).

El nitrógeno es un nutriente esencial, clave para mantener la fertilidad de los agroecosistemas. Una de sus formas minerales más frecuentes en los suelos es el ión amonio, que puede tener origen a partir de la fijación biológica de los diazótrofos o por amonificación, proceso de mineralización caracterizado por su ubicuidad y amplio rango de organismos intervinientes. Por esta razón, es necesario entender la naturaleza de los procesos que propician la liberación de amonio y los factores que los condicionan, mediante el establecimiento y estandarización de métodos sencillos, de alta sensibilidad y fácilmente repetibles, con el objetivo de obtener un volumen de datos a partir de los cuales generar información consistente.

El método propuesto en este capítulo permite capturar el amonio liberado en muestras de suelo en incubación y cuantificarlo a través de espectrofotometría, mediante la utilización del reactivo de Nessler como agente colorimétrico.

Según la ley de Lambert-Beer (también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer), el aumento de la concentración de una sustancia en solución se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia, dentro de la zona de cumplimiento de la ley (a concentraciones elevadas se pierde linealidad y los datos se vuelven poco fiables).

Como indicador colorimétrico se utiliza el reactivo de Nessler, una sustancia química capaz de detectar pequeñas concentraciones o trazas de nitrógeno amoniacal, es decir, como amonio

o amoníaco. Se torna de coloraciones que oscilan entre amarillo y pardo, en función de la concentración de nitrógeno, con posible formación de precipitados en caso de altas concentraciones (Vogel, 1976). Su rango de detección es de 0,4 a 5 mg.l⁻¹ de nitrógeno amoniacal. La intensidad de la coloración es susceptible de ser cuantificada como absorbancia mediante la utilización de un espectrofotómetro UV-Visible, con longitudes de onda que van desde los 400 hasta los 425 nm.

1.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMONIO A PARTIR DE LA ACTIVIDAD AMONIFICANTE

En el siguiente apartado realizaremos el paso a paso para determinar la producción de amonio a partir de la actividad amonificante.

1.1.1. Fundamento del método

El método está basado en la incubación de muestras de suelo en un sistema cerrado, en condiciones controladas y que propician la actividad microbiana amonificante. El amonio liberado y volatilizado se captura en ácido sulfúrico y posteriormente se cuantifica por espectrofotometría, utilizando el reactivo de Nessler.

1.1.2. Objetivo de la determinación

Detectar y cuantificar el amonio liberado por muestras de suelo, tras un período de incubación, proveniente de la amonificación de fuentes orgánicas de nitrógeno, analizando suelos bajo diferentes prácticas agrícolas.

1.1.3. Equipamiento

Los elementos necesarios son los detallados a continuación:

- Espectrofotómetro UV-Visible Biotraza 722.
- Estufa para incubación.
- Frascos de cierre hermético, de 270 a 300 ml de volumen.
- Bolsitas de polietileno para incubación de 30 micrones de espesor.
- Micropipetas.
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.1.4. Reactivos

Los reactivos necesarios son los siguientes:

- Ácido sulfúrico en concentración 0,02 N. Reacciona con el amoníaco liberado formando sulfato de amonio.

- Reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%). Para la detección del nitrógeno amoniacal capturado por la solución de ácido sulfúrico.

1.1.5. Acondicionamiento del material

Se trabaja con muestras de suelo secas al aire, molidas y tamizadas con malla de 2 mm.

1.1.6. Procedimiento

El procedimiento a llevar a cabo es el detallado a continuación.

1.1.6.1. Confección de la curva de calibración

La curva de calibración permite, a partir de estándares de concentración de amonio conocidos, determinar la concentración desconocida de muestras de diferente origen.

Los estándares se preparan con una solución de sulfato de amonio de 10 milimolar (mM) combinado con agua destilada y reactivo de Nessler en proporción del 10% del total de la solución (Maureira Chicahual, 2013).

Se obtiene la absorbancia de los estándares con el empleo del espectrofotómetro UV-Visible, utilizando un haz de luz monocromático de 400 nm. Con los datos obtenidos, se construye una curva que expresa la absorbancia (variable dependiente) en función de la concentración de amonio en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ o ppm (variable independiente). Estas variables presentan un elevado coeficiente de determinación (R^2), que indica la alta correlación existente entre ambas (cumpliendo la ley de Lambert-Beer).

Con la ecuación de la línea de tendencia de la curva, se calculan los valores de soluciones de concentración desconocida.

Se preparan tres réplicas de siete estándares de concentración de amonio creciente y conocida, utilizando una solución de sulfato de amonio 10 mM, agua destilada y reactivo de Nessler en proporción del 10% de solución (1 ml de Nessler en 10 ml de solución).

Se realizan lecturas de absorbancia empleando el espectrofotómetro UV-Visible con longitud de onda del haz de luz monocromática de 400 nm.

Se grafican los valores de las tres réplicas y se obtienen tres curvas. Se utiliza como curva de calibración aquella que tiene mayor coeficiente de determinación, es decir, aquella que presenta mayor correlación entre concentración de amonio y absorbancia.

Tabla N° 1. Valores de nitrógeno anaeróbico (Nan) en distintos órdenes de suelos, cultivos y manejos

	0	1	2	3	4	5	6
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 10 mM (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
Amonio (ppm)	0	0,95	1,9	2,85	3,8	4,75	5,7

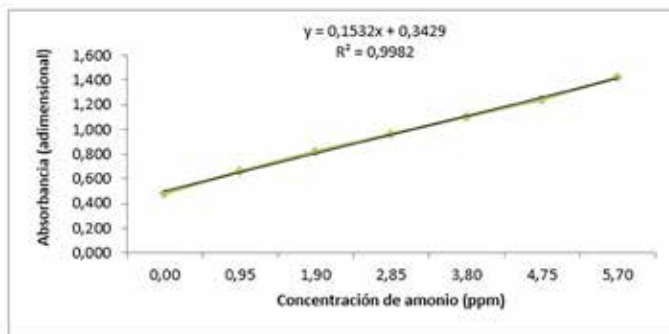


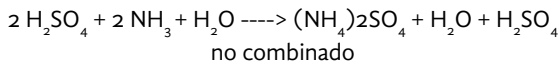
Figura N° 1. Curva de calibración: absorbancia en función de la concentración de amonio. En la parte superior se observa la ecuación correspondiente a la línea de tendencia y el valor de R^2 , que indica una alta correlación entre variables.

Se obtiene la ecuación de la línea de tendencia de la curva en la que se despeja la variable independiente (x) para obtener la concentración de amonio (ppm):

$$x = (y - a) / b$$

1.1.6.2. Procedimiento con muestras de suelo
Se deben cumplir los siguientes pasos:

- 1) Humedecimiento: se pesan 30 g de suelo y se humedecen de manera homogénea hasta alcanzar aproximadamente un 60% de su capacidad de retención hídrica.
- 2) Dispositivo de incubación: se introduce la muestra humedecida en bolsitas de polietileno de 30 micrones de espesor. Este material es permeable a ciertos gases, como dióxido de carbono o amoníaco, que lo atraviesan por sus poros. En los frascos se cargan 30 ml de ácido sulfúrico 0,02 N. Las bolsitas con las muestras se colocan de manera suspendida dentro de los frascos, evitando que tomen contacto con el ácido en el fondo y sujetándolas en la parte superior con la tapa al cerrar el frasco.
- 3) Incubación: estas cámaras húmedas son llevadas a incubación en estufa a 28 o 30 °C durante 7 días. En tales condiciones de humedad y temperatura se estimula la actividad microbiana (García Izquierdo *et al.*, 2003). A través de la actividad amonificante, se libera amonio al medio que posteriormente se volatiliza por un proceso físico como amoníaco. Este gas atraviesa los poros de la bolsita y es atrapado por la solución de ácido sulfúrico, según la siguiente reacción:



- 4) Lectura de absorbancia: tras la semana de incubación, de cada frasco se extraen 18 ml de la solución y se los combina con 2 ml de reactivo de Nessler, manteniendo así la proporción del 10%. Se procede a la lectura de la absorbancia por triplicado de cada muestra, cargando las alícuotas en cubetas de cuarzo de 3 ml de volumen. Se emplea el espectrofotómetro UV-Visible con una longitud de onda de 400 nm de luz monocromática. Es sumamente importante mantener la limpieza de las paredes de las cubetas, así como enjuagarlas bien entre mediciones con agua destilada, a modo de evitar cualquier tipo obstrucción o error en la medición. También se realiza la lectura de absorbancia de blancos, constituidos por 9 ml de agua destilada y 1 ml de reactivo de Nessler (proporción del 10%). Los datos obtenidos se utilizan para descartar la coloración propia del reactivo de Nessler, no correspondiente a la detección de amonio.

1.1.7. Cálculos

Tras promediar las lecturas de cada muestra, se utiliza la ecuación de la línea de tendencia de la curva de calibración para convertir

los valores de absorbancia en concentración de amonio (ppm). Los resultados se corrigen con el valor obtenido de los blancos.

1.1.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE

1. Ensayo de utilización de abonos orgánicos en producción hortícola¹. Se utilizaron muestras de suelo de un Hapludert típico, provenientes de un ensayo realizado en el marco de un proyecto de investigación en el que participaron la cátedra de Edafología de la FCAYF (UNLP), el Inta La Plata y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE. El ensayo se realizó en la localidad de Gorina, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires, en un sistema intensivo de producción hortícola bajo cobertura plástica y fertirriego por goteo.

Con la hipótesis de que la enmienda orgánica utilizada habitualmente por los productores del lugar, en general cama de pollo sin previo proceso de compostaje, producía efectos adversos a largo plazo –entiéndase salinización, alcalinización, desbalance de nutrientes– y en búsqueda de alternativas superadoras que permitan mejorar las propiedades del suelo, se realizó el ensayo en cuestión, donde se compararon los siguientes tratamientos:

- T1: sin aplicación de enmiendas.
- T2: agregado de cama de pollo conforme se realiza en la región. Es decir, sin previo compostaje y en dosis aproximada equivalente a 30 o 40 tn/ha que representa en volumen 100 m³/ha.
- T3: agregado de compost de cama de pollo en dosis correspondiente al contenido de materia orgánica del T2.
- T4: agregado de compost de cama de pollo con doble dosis del T3.

Cada tratamiento contó con 4 repeticiones, obteniendo un total de 16 parcelas y se tomaron muestras a 2 profundidades: 0-15 cm (superficie) y 15-30 cm (profundidad). Conforme a lo mencionado, se trabajó con un total de 32 muestras.

Se realizaron los pasos descritos en «Procedimiento» y «Cálculos» para determinar la actividad amonificante de las muestras

1. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto «Evaluación de enmiendas orgánicas sobre el suelo y cultivos hortícolas protegidos», cátedra de Edafología de la FCAYF (UNLP) y cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

de suelo bajo los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos se expresan en el Figura N° 2.

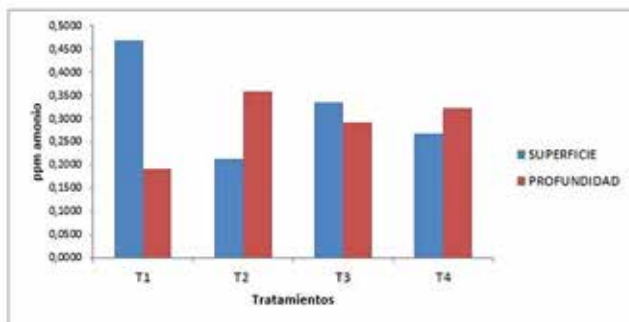


Figura N° 2. Actividad amonificante de los diferentes tratamientos y profundidades, expresada en ppm de amonio.

No se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre profundidades de muestreo (método de comparación LSD Fisher, con nivel de significación de 0,05).

Sin embargo, es posible percibir las diferencias entre las prácticas a partir de los resultados obtenidos. Si bien el testigo presentó mayor amonificación en superficie, en los tratamientos donde se aplicaron enmiendas orgánicas se manifestó una considerable actividad amonificante hasta los 30 cm de profundidad.

Se sugiere continuar con la investigación presentada, en búsqueda de obtener información y resultados concluyentes sobre los efectos de aplicación de enmiendas orgánicas compostadas.

2. Ensayo de utilización de diferentes compost en un suelo arenoso². Las muestras provinieron de un ensayo que se planteó en la localidad de Santa Ana, provincia de Corrientes, en colaboración con el equipo del Crub-Comahue Bariloche. El ensayo constaba de 14 tratamientos dispuestos en parcelas de 1 m x 1 m cada una que se replicaron en 3 bloques, haciendo un total de 42 parcelas.

Los tratamientos correspondieron a la aplicación de compost de diferentes orígenes: Compost de Biosólidos (Bio), Compost de

2. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto PICT-2008-1027 (ANPCyT), «Aspectos ambientales del uso de compost urbanos y agroindustriales en tres ecoregiones de Argentina», cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE, Grupo de suelos-Crub-Comahue.

Feedlot (CF), Compost de cama de gallina (CG), Compost de Residuos sólidos urbanos (Rou) y de mezclas de estos, como ser Rou-CF y Rou-CG.

Todas las aplicaciones se realizaron en dosis de 20 y 40 tn.ha⁻¹ y además se incorporó un tratamiento de control (Ctrol) y un tratamiento con fertilización inorgánica (Fi).

Se realizaron cuatro muestreos: diciembre de 2011, junio de 2012, junio de 2013 y diciembre de 2013, en los tres últimos se muestrearon dos profundidades, 0-10 cm y 50-60 cm, mientras que en el primero solo fue de 0-10 cm.

En todas las muestras obtenidas se determinó la producción de ppm de amonio por el método antes descrito, dando los siguientes resultados.

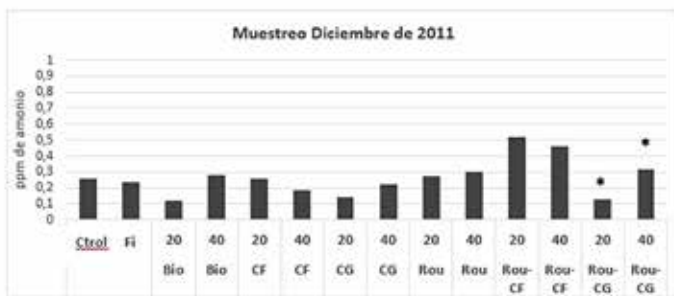


Figura N° 3. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de diciembre de 2011. Los * muestran las diferencias significativas entre esos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).



Figura N° 4. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de junio de 2012. Los * muestran diferencias significativas entre ambas profundidades en dichos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).

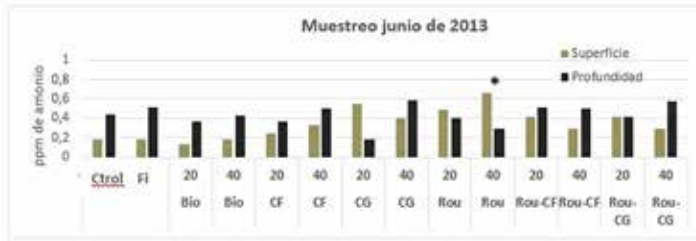


Figura N° 5. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de junio de 2013. Los * muestran diferencias significativas entre ambas profundidades en dichos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).

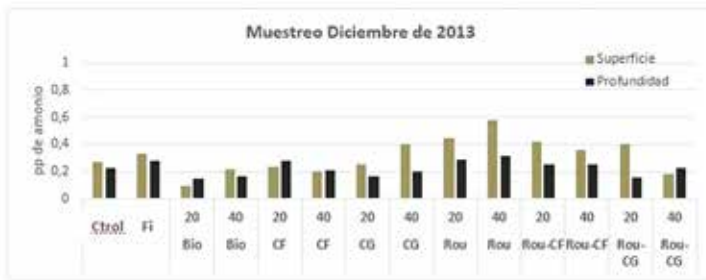


Figura N° 6. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de diciembre de 2013. No existieron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

Mediante la utilización de Nessler para la cuantificación de amonio, se pudo detectar la producción del mismo en prácticamente todas las muestras analizadas y una producción muy variable con relación a los años de muestreos, a los residuos y dosis utilizadas, así como también con relación a la profundidad de muestreo.

Luego de realizar el análisis de varianza, utilizando el estadístico Tukey, con un nivel de significancia de 0,05, se detectaron diferencias significativas en tres de los cuatro muestreos.

En diciembre de 2011, ambas dosis del tratamiento con mezcla de Rou-CG se diferenciaron significativamente. En junio de 2012 y junio de 2013, las diferencias se encontraron entre las muestras de superficie y profundidad para tres tratamientos en el primero y un tratamiento en el segundo.

1.2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMONIO A PARTIR DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL N₂

En el siguiente apartado realizaremos el paso a paso para determinar la producción de amonio a partir de la fijación biológica del N₂.

1.2.1. Fundamento del método

A partir de la fijación biológica del nitrógeno, se incorpora N al medio, cuya primera molécula disponible es el amonio (Baca, Soto Urzúa y Pardo Ruiz, 2000).

Se incuba un aislamiento de un microorganismo fijador de nitrógeno en un medio con suelo al 10% (1 g suelo y 10 ml de agua), de acuerdo con Mantilla, Anaya y Zumaqué (2007), y el amonio que libera al medio se puede cuantificar colorimétricamente a partir de la reacción con el reactivo de Nessler que desarrolla una intensidad de color con relación a la cantidad de esta molécula presente en el medio (Maureira Chichual, 2013).

1.2.2. Objetivo de la determinación

Cuantificar el amonio que pueden aportar al medio aislamientos fijadores de nitrógeno atmosférico y que pueda ser aprovechado en el sistema suelo.

1.2.3. Equipamiento

Los elementos necesarios son los detallados a continuación:

- Flujo laminar
- Autoclave
- Espectrofotómetro UV-Visible Biotraza 722
- Shaker
- Micropipetas
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.2.4. Reactivo

El reactivo necesario es el detallado a continuación:

- Reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%) para la detección del nitrógeno amoniacal.

1.2.5. Acondicionamiento del material

Para las incubaciones, se trabaja con suelo y agua debidamente esterilizados. En el caso de los aislamientos a testear, deben estar en activo crecimiento.

1.2.6. Procedimiento

Se deben cumplir los siguientes pasos:

1. **Dispositivos para la incubación.** Se pesa 1 g de suelo, se coloca en un tubo de ensayo y se le adicionan 10 ml de agua. Estos dispositivos se realizan por triplicado para cada aislamiento y también para la situación de referencia que sería un tubo con suelo, sin inoculación, que servirá de referencia para descontar el amonio presente en el sistema.
2. **Siembra de los aislamientos.** Mediante un ansa y bajo flujo laminar se inocula con una pequeña porción del crecimiento de cada aislamiento dentro del tubo con suelo y agua.
3. **Incubación.** Todos los tubos son llevados a incubación a Shaker, a 28 o 29 °C, durante un tiempo de 72 horas con agitación constante a 150 rpm.
4. **Lectura en espectrofotómetro.** Luego del período de incubación, se filtra todo el contenido del tubo, se toman 9 ml de este filtrado y se incorpora 1 ml de reactivo de Nessler (proporción al 10%). Para la lectura en el espectrofotómetro, se procede según indicaciones del fabricante, realizando la calibración del blanco (agua) y la lectura de la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 400 nm. También se incorpora un blanco en la lectura, ya que el Nessler por sí mismo desarrolla cierta coloración que debe ser descontada. Se registran todas las lecturas de absorbancia tanto de los aislamientos como del suelo sin inocular y se utiliza la ecuación de la línea de tendencia de la curva de calibración –procedimiento explicado en la sección anterior– para convertir los valores de absorbancia en concentración de amonio (ppm).

1.2.7. Cálculos

Se obtienen los ppm de amonio, tanto de las muestras como para la referencia, a partir de la fórmula generada en la curva.

$$\text{Fórmula de la curva patrón: } x = y - a/b$$

Luego se obtiene la concentración de amonio en ppm que haya liberado cada aislamiento, realizando la corrección, teniendo en cuenta los blancos de suelo para obtener el valor real de la producción corregida.

Producción de amonio real = ppm del aislamiento – ppm de suelo sin
inocular

1.2.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología
Agrícola de la FCA-UNNE

Producción de amonio por parte de aislamientos de microorganismos rizosféricos. Se trabajó con una serie de aislamientos generados a partir de suelo rizosférico de plantas de algodón. Los mismos crecieron a partir de un medio de cultivo que carecía de nitrógeno, por lo que se asume que son fijadores libres de nitrógeno atmosférico. A partir del método antes mencionado, se cuantificó esa producción de amonio.

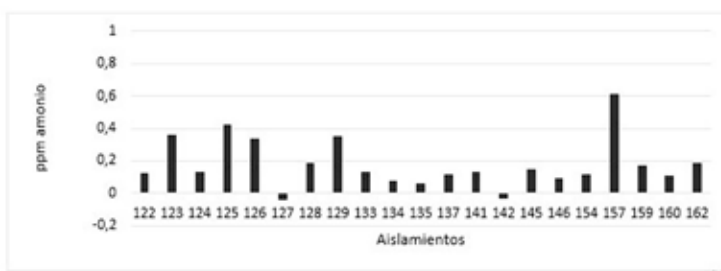


Figura N° 7. Producción de amonio expresada en ppm de amonio para los distintos aislamientos de microorganismos fijadores de nitrógeno.

Los valores que se observan en la Figura N° 7 son corregidos al restar del sistema (suelo inoculado) los blancos de los suelos, por lo tanto, esa producción de amonio se atribuye a los aislamientos, es decir, se pudo cuantificar una producción de amonio a partir del método utilizado en la mayoría de los aislamientos testeados.

En resumen. Aplicando esta técnica fue posible detectar y cuantificar el amonio liberado por muestras de suelo, tras un período de incubación, proveniente tanto de la amonificación de fuentes orgánicas de nitrógeno como a partir de la fijación biológica del nitrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZCÓN BIETO, J. y Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2a ed.) España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- BACA, B.E., Soto Urzúa, L. y Pardo Ruiz, M.P. (2000). «Fijación biológica del nitrógeno». *Elementos: Ciencia y Cultura*, 7(38), 43-49.
- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Paraninfo.
- FASSBENDER, H. y Bornemisza, E. (1987). *Química de suelos, con énfasis en América Latina*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- GARCÍA IZQUIERDO, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T. y Trasar-Cepeda, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Mundi-Prensa.
- MANTILLA, C.L., Anaya, M.V. y Zumaqué, L.E.O. (2007). «Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos». *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14. Córdoba, Colombia.
- 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*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Odontología. Disponible en <https://bit.ly/3tuYfzS>
- VOGEL, A. (1976). *Química analítica cuantitativa*. Buenos Aires: Kapelus.

Capítulo 2. Capacidad celulolítica del suelo en aerobiosis

María C. Iglesias, Amalia M. E. Romero
y Marcela R. Cossoli

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal, es el polisacárido más importante en la constitución de los restos vegetales, llegando hasta un 60% o más del peso seco, dependiendo del tipo de vegetal. Representa una gran fuente de energía para los microorganismos, principales responsables de la descomposición de la materia orgánica del suelo, como también para otros organismos del suelo, y es fuente de carbono que promueve la actividad microbiana y la estabilidad de los agregados del suelo. El conocimiento en mayores detalles de los procesos y microorganismos que actúan en la degradación de la celulosa radica en que la descomposición de los residuos vegetales provee materia orgánica necesaria para mejorar y/o mantener la calidad de los suelos¹.

La importancia agronómica del estudio de la descomposición de la celulosa o «celulólisis» radica en que los rastrojos o residuos de las cosechas, así como los excedentes de los pastoreos, constituyen el principal aporte de este material a los agroecosistemas, como lo hacen las hojarascas en los bosques y el monte, manteniéndose el nivel de materia orgánica de un suelo.

La disponibilidad de este sustrato es un factor importante que influye en el nivel de actividad de los organismos del suelo. Por lo tanto, se encuentra relacionado con el uso del suelo y su descomposición representa una fuente de nutrientes que podrán ser utilizados por las plantas y diferentes organismos presentes en el ecosistema, teniendo en cuenta que la celulólisis es solamente

1. Agradecimientos por los aportes a la implementación y uso de estas metodologías al Ing. Agr. Juan Quant Bermúdez†, al Ing. Agr. Crispín Venialgo‡, al Ing. Agr. (Dr.) Juan Prause y al Dr. Luis Wall, así como también a todos y cada uno de los alumnos/as, pasantes y becarios/as que aportaron con sus trabajos a consolidar las técnicas y sus resultados.

una parte del conjunto de fenómenos involucrados en la mineralización de los vegetales incorporados al suelo y es un proceso lento en relación con otros compuestos del carbono.

La descomposición de los restos vegetales de cualquier naturaleza se realiza entre dos extremos de potencial redox, condiciones principalmente aeróbicas y/o preponderantemente anaeróbicas. En el primer caso intervienen hongos, actinomicetes o actinobacterias, bacterias, protozoos, entre otros. En cambio, en el segundo predominan las bacterias y participan algunos hongos de grupos específicos.

La degradación de los restos orgánicos está influenciada por las condiciones ambientales como la humedad, la temperatura, la aireación, el contenido y la composición de materia orgánica, como así también de los grupos de microorganismos intervinientes.

De la degradación de celulosa en medio aeróbico se llega a la formación de biomasa microbiana, CO_2 , H_2O , ácidos urónicos, entre otros, favorables para la estructuración del suelo.

Los factores más importantes que afectan la degradación son:

- Nivel de N: los microorganismos requieren una parte de N por cada 35 o 50 partes de celulosa.
- Nivel de P: en algunos suelos este elemento puede ser limitante.
- Temperatura: el proceso se realiza desde el punto de congelamiento hasta los 65 °C, lo que varía realmente es la población actuante.
- pH: tiene mayor influencia en los procesos aeróbicos, dado que las bacterias anaeróbicas son más tolerantes a los cambios. La celulólisis es más activa en suelos neutros o bien provistos de bases.
- Humedad y aireación: condiciona la población actuante. Por el rendimiento energético, el proceso es más lento en ambientes anegados.

A mayor profundidad en los suelos, hay menor actividad, dependiendo de las características del suelo y de las condiciones ambientales. La presencia de fuentes de carbono más simples, como disacáridos y glucosa, entre otros, incrementan la actividad. La proporción de lignina tiene un efecto inhibitorio mecánico resultante de la estrecha unión entre estos polisacáridos, siendo una barrera inicial y debiendo darse determinada sucesión microbiana como ser lignolíticos-celulolíticos (Alexander, 1981; Cátedra de Microbiología Agrícola, 1999-2020; Coyne, 2000; Frioni, 1990, 2011; Madigan *et al.*, 2015).

La celulosa es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos, o formando un complejo denominado «celulosoma» (Ramírez y Cocha, 2003). La hidrólisis de la celulosa se realiza mediante un complejo enzimático llamado celulasas, integrado por algunas exoenzimas inducibles frente al agregado del sustrato, constituido básicamente por tres enzimas: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas. La complejidad del sistema enzimático implicado y la heterogeneidad de las técnicas y unidades empleadas para la cuantificación de la degradación de celulosa hacen a su medición un desafío. El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) es el más usado en la actualidad para la cuantificación y determinación de la actividad celulolítica (Cortes Ortiz *et al.*, 2013; Cadenas, 2016). Además, se pueden encontrar otras técnicas como el recuento de microorganismos específicos por gramo de suelo y dentro de las denominadas «técnicas ecológicas», la técnica de Schaefer (1971), que entierra trozos de papel de filtro dentro de sobres de malla de polietileno; Landaburu (1982) utilizó un método parecido, sustituyendo el papel de filtro por tela de algodón y la técnica ecológica de Winogradsky (1949) y sus diferentes modificaciones, con microdiscos de papel de filtro (Quant Bermúdez y Bakos, 1984). En estas últimas técnicas ecológicas, luego de un determinado período de incubación, se registra el porcentaje de degradación y/o la determinación de la pérdida de peso. Es posible en estas técnicas aplicar y calcular la constante de degradación por el tiempo (Van Wesemael, 1993).

2.1. FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS

Los tres métodos presentados se basan en la incorporación del sustrato «celulosa» al suelo *in situ*, a una muestra de suelo en laboratorio, dentro de una pila de compostaje y mediante observaciones periódicas y al final de la incubación o del tiempo estimado, se describirá el estado del sustrato, se evaluará la degradación y se determinará la masa remanente.

Dentro de las «técnicas ecológicas» describiremos tres técnicas utilizadas en suelos con las modificaciones o las determinaciones complementarias incorporadas.

2.1.1. Placa de suelo con microdiscos de papel de filtros

Esta metodología ha tenido modificaciones a lo largo de los años:

- Winogradsky (1949): placa de sílicogel con papel en la superficie, donde se siembran granos de suelo. Las colonias se desarrollan sobre la superficie del papel, alrededor de los granos de suelo.
- Fuentes Godo (1968): incorpora suelo granulado en placas y, por encima, se ubica el papel. Las colonias crecen en la superficie del papel.
- Quant Bermúdez y Bakos (1984): utilizan placas de suelo granular con microdiscos de papel de filtro en la superficie.

A partir de los 2000 se incorporó en diferentes trabajos de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE el cálculo de la constante de degradación (Van Wesemael, 1993; Prause *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2012).

2.1.1.1. Objetivo de la determinación

Evaluar la degradación de celulosa en el tiempo mediante la comprobación de la desaparición del sustrato incorporado.

2.1.1.2. Equipamiento y materiales

El equipamiento y los materiales necesarios son los detallados a continuación:

- Cámara de cultivo o estufa de incubación
- Balanza
- Muestras de suelo
- Placas de Petri
- Pipetas
- Agua para humedecimiento
- Fuente de celulosa: papel de filtro en microdiscos obtenidos con perforadora, se utilizan 50 microdiscos por cada caja.

2.1.1.3. Acondicionamiento del suelo

Para lograr el acondicionamiento del suelo, se realizarán los siguientes pasos:

1. Pesar 30 g de suelo por muestra con sus respectivas repeticiones, llevar a placa de Petri. Suelo seco al aire, molido y tamizado (malla 2 mm).
2. Humedecer el suelo hasta 40 o 60% de su capacidad de retención (previamente determinar la capacidad máxima de retención de agua).
3. «Sembrar» con una pinza 50 microdiscos de papel de filtro en forma ordenada (para facilitar las observaciones) sobre toda la superficie de la placa de suelo, cuidando que tengan buen contacto con el mismo.

4. Tapar la placa de Petri.
5. Repetir el procedimiento para cada muestra.
6. Pesar la muestra de suelo húmeda con los microdiscos sembrados, para el control de humedad semanalmente, reponiendo cuando sea necesario.
7. Llevar a la cámara de cultivo. Incubar en las condiciones de temperatura que se quieran evaluar.
8. Pesar previamente los 50 microdiscos de papel de filtro para obtener el dato en mg de sustrato incorporado.

La lectura de cada caja de Petri es realizada a intervalos regulares. El lapso entre una y otra lectura depende del tiempo de incubación que se haya previsto.

2.1.1.4. Conteo de los microdiscos

Para realizar la medición, se observa el nivel de degradación de cada microdisco.

- Degradación parcial: en esta etapa se observa que el microdisco va perdiendo consistencia, aunque la extensión y el sitio de la zona atacada varía mucho. En algunos casos aparecen sobre el microdisco gotas de consistencia mucilaginosa, coloraciones o crecimiento miceliar producto de la actividad microbiana.
- Degradación total: el microdisco ha perdido por completo su consistencia, es imposible separarlo del suelo y está prácticamente desintegrado o ha desaparecido.

«A», **grado de utilización del sustrato.** Cada microdisco representa un valor del 2% del total de la celulosa (50 microdiscos por placa) y el grado de ataque se expresa en porcentaje sobre el total. También se puede expresar estimando en mg de celulosa degradada, dado el peso inicial de los 50 microdiscos.

«B», **tiempo que se ha asignado a las lecturas.** Al que se le puede asignar un valor según el intervalo transcurrido entre lectura y lectura. No es lo mismo un 100% de degradación total a los 15 días que un 100% de degradación total a los 30 días. Cuando se analiza la degradación con relación al tiempo, para determinar el incremento entre cada lectura u observación se debe descontar o restar la anterior.

La descripción que se ha hecho corresponde a la placa básica, a partir de esta se pueden introducir todas las variantes que se deseen, con el fin de estudiar y analizar los diferentes factores que intervienen en la celulólisis.



Figura N° 1. Vista de una placa de Petri, con suelo y microdiscos (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 2. Vista de placas de Petri, con suelo y microdiscos inicial y final (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

Se puede observar la diversidad microbiana registrando las manifestaciones de las diferentes colonias a medida que avanza la degradación.

Es posible, por medio del microscopio de barrido (MEB), mediante métodos de preparación convencional, realizar observaciones de la diversidad de manifestaciones y llegar a un escaneado electrónico (*Scanning electron micrographs*) de la microflora que coloniza la celulosa (Metcalf *et al.*, 2002).

2.1.2. Minired con celulosa en bandejas de suelo

En esta técnica se adaptó la metodología de redes de degradación o *litter bag*. Se incorporan las bandejas con el suelo, las miniredes con la fuente de celulosa y la incubación en cámaras de cultivo con humedad y temperatura controladas (Iglesias y González Lequizamón, 1988).

2.1.2.1. Objetivo de la determinación

Evaluar la degradación de celulosa en un tiempo determinado, mediante la utilización de miniredes con placas de celulosa pequeñas en cajas de incubación, calculando la masa remanente final.

2.1.2.2. Equipamiento y materiales

Los equipos y materiales necesarios son los siguientes:

- Cámara de cultivo o estufa de incubación.
- Estufa de secado.
- Balanza.
- Bandejas con tapa de volumen determinado o caja de incubación con tapa (200 ml/400 ml).
- Muestras de suelo. Cantidad de suelo por unidad, acorde a la caja elegida.
- Fuente de celulosa: papel de filtro de 1 mm de espesor de 10 x 10 cm (1 por caja) o ajustado al tamaño de la caja.
- Red de nylon con un entramado de 2 x 2 mm (1 por caja), ajustado al tamaño de la caja.
- Pipetas.
- Agua destilada.

2.1.2.3. Procedimiento

El procedimiento lleva los siguientes pasos a seguir:

1. Armar pequeñas redes de nylon en las que se introduce una placa de celulosa de tamaño acorde a la red, previamente pesada.
2. Colocar en la caja de incubación la mitad de la muestra de suelo, luego la minired y por encima, el suelo restante. De



Figura N° 3. Examen con lupa de la superficie de las placas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

esta manera, la minired con placa de celulosa queda entre capas de suelo de aproximadamente 2 cm.

3. Humedecer lentamente a capacidad de campo o con los ajustes necesarios por el tipo de suelo y las alteraciones del acondicionamiento de la muestra.
4. Incubar a la temperatura seleccionada.
5. Incubar durante el tiempo de estudio, 30-45 días, a temperatura ambiente, registrando la misma y controlando que se mantenga el nivel de humedad o bien en estufa, a temperatura controlada, con el periódico control de humedad.
6. Retirar las miniredes al cumplirse el tiempo de incubación, lavar cuidadosamente con agua, registrar la presencia de manchas, hongos y mucílago, secar en estufa hasta peso constante, registrar el peso y determinar la masa remanente.

2.1.3. Redes de degradación con celulosa-litter bag

Se adapta la metodología de redes de degradación a campo *litter bag* con diferentes materiales celulósicos, como rastrojos y hojarasca, según antecedentes de Van Wesemael (1993), y se colocan en las redes placas de celulosa, con el fin de uniformar el sustrato y poder realizar estudios comparativos en diferentes ambientes, sitios, lotes con distintos cultivos, pilas de compost, entre otras opciones.

2.1.3.1. Objetivo de las determinaciones

El objetivo es evaluar la degradación de celulosa a campo bajo las condiciones climáticas del sitio.

2.1.3.2. Materiales y herramientas

Los materiales y herramientas necesarios son los siguientes:

- Balanza.
- Estufa de secado.
- Estacas, hilo, tijeras, bolsas, palas.
- Redes de nylon con un entramado de 2 mm (*litter bags*).
- Placa de celulosa de 10 x 10 cm previamente pesadas (g) o ajustado al tamaño de red elegido.

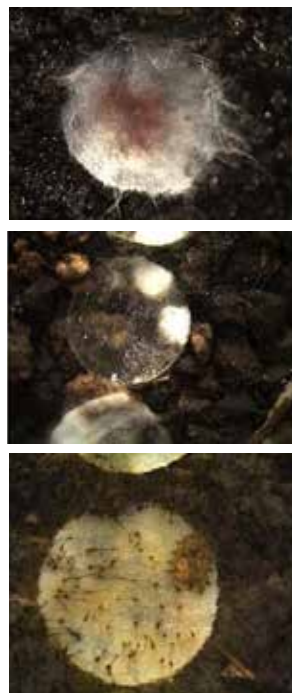


Figura N° 4. Examen con lupa de la superficie de las placas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

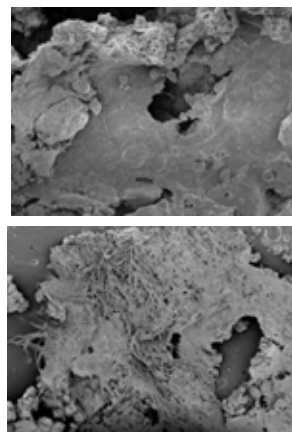


Figura N° 5. Observaciones con microscopio electrónico de barrido (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 6. Secuencia para el armado y control de la metodología empleada para evaluar la degradación de celulosa en miniredes. Incubación de 45 días con humedad constante y temperatura controlada (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

2.1.3.3. Procedimiento

Se utilizan placas de celulosa. La técnica consiste en la colocación de estas placas de celulosa de peso conocido y dispuestas en las redes de degradación, a profundidad determinada constante para todos los sitios, tratamientos o repeticiones.

Un tiempo de incubación *in situ* o de estadía en el campo, dependiendo de la placa de celulosa colocada y de la planificación realizada.

El retiro de las mismas, para ser llevadas al laboratorio, se realiza al cumplirse el tiempo planificado.



Figura N° 7. Degradación en laboratorio con humedad controlada, control a los 15 días (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).



Figura N° 8. Representación esquemática de la metodología empleada para evaluar la degradación de celulosa a campo.

En el laboratorio, las placas son lavadas minuciosamente, llevadas a estufa a temperatura de secado hasta peso constante y se determina el peso seco de las mismas. De esta manera, se calcula el porcentaje de degradación y/o la masa remanente de las placas de celulosa en un determinado tiempo.

2.2. CÁLCULOS

En los tres casos se puede calcular el porcentaje de degradación o la masa remanente:

- I- Determinar el porcentaje de degradación total de los microdiscos y calcular los mg de celulosa degradada partiendo del peso de los microdiscos.
- II y III- Determinar la masa remanente por la diferencia de peso de las placas.

Masa remanente en % = $\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$ y en todos los casos se puede calcular la constante de degradación por el tiempo de incubación $(-k \cdot t)$ (Van Wesemael, 1993).

$$(-1) \cdot \ln (MR/100) / T$$

Donde: Ln es el logaritmo natural, MR es la masa remanente y T es el tiempo.

Para que los valores de la constante de degradación sean comparables, se debe prestar atención a que el tiempo sea registrado de la misma manera (días, meses o años).

2.2.1. Ejemplos

Determinaciones comparando sitios, manejos y tiempos de incubación del proyecto interdisciplinario Biospas (Biología del Suelo y Producción Agropecuaria Sustentable) 2009-2013 y del proyecto Biospas, subproyecto PID N° 52 microorganismos cultivables, del Grupo 8 Micro-FCA-UNNE 2009-2013. Corresponden a muestras de Monte Buey y Bengolea (Córdoba), Pergamino (Buenos Aires) y Viale (Entre Ríos), con tres situaciones distintas en cada uno: AN (Ambiente Natural de cada localidad), BPA (Buenas prácticas agrícolas-rotación intensiva de cultivos) y MPA (Prácticas agrícolas no sustentables-monocultivo).



Figura N° 9. Redes de degradación. Degradación en el campo luego de 30 días con escasas precipitaciones (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

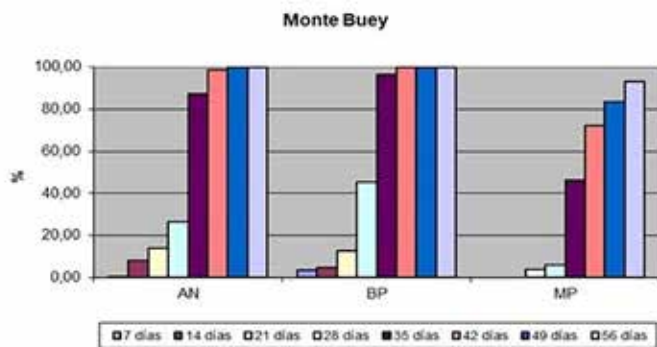


Figura N° 10. Placas de suelo con microdiscos de celulosa. Porcentaje de degradación con el transcurso del tiempo (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

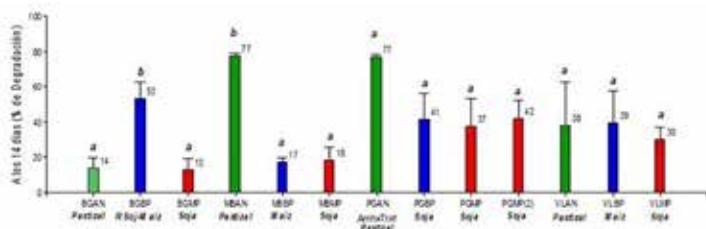


Figura N° 11. Porcentaje de degradación de celulosa en placas de suelo (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

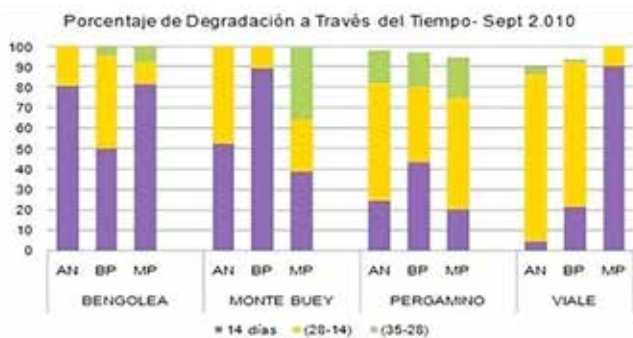


Figura N° 12. Evolución de la degradación de celulosa a través del tiempo en porcentaje (Gómez *et al.*, 2012; Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

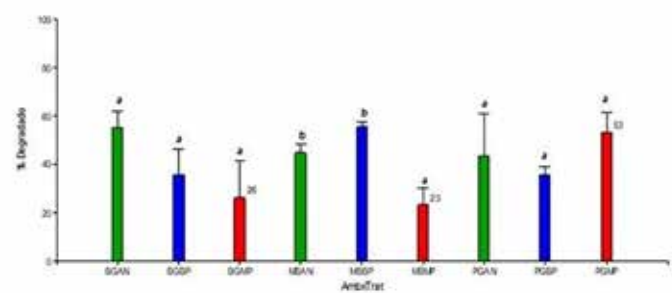


Figura N° 13. Porcentaje de degradación de placas de celulosa en miniredes con temperatura y humedad controladas (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

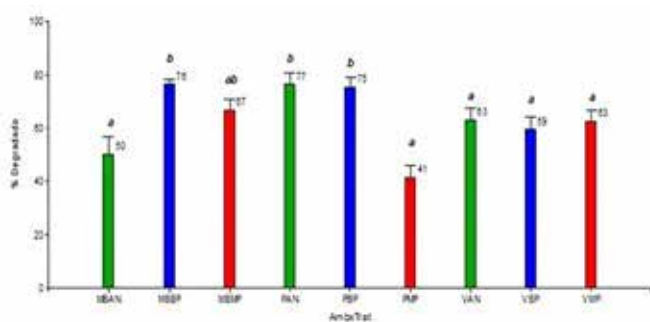


Figura N° 14. Porcentaje de degradación de placas de celulosa a campo mediante redes de degradación (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

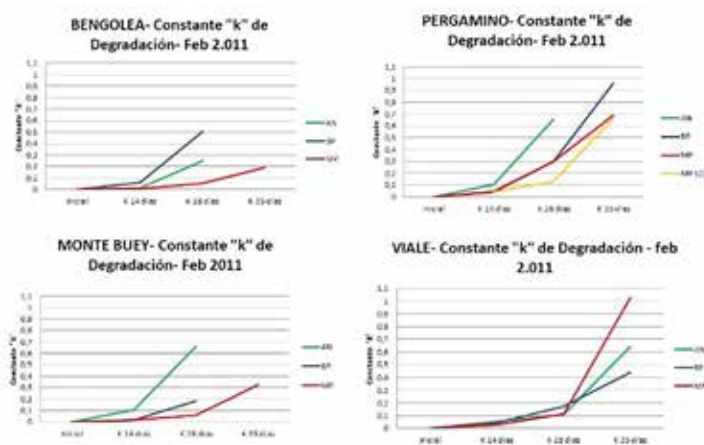


Figura N° 15. Constante «k», velocidad de la degradación a través del tiempo (Gómez *et al.*, 2012; Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

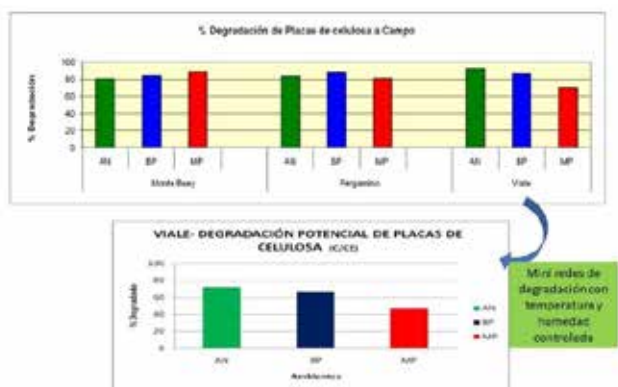


Figura N° 16. Utilización de redes y miniredes de degradación a campo y en laboratorio (Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE).

2.3. OTRAS CONSIDERACIONES

Para la utilización de redes de degradación como trampa para posteriores aislamientos, se debe tener presente que la degradación microbiana de celulosa también puede ser estudiada realizando otros experimentos con la celulosa contenida en las redes de nylon (*litter bags*) y enterrada en el campo que permita identificar las comunidades microbianas. Para determinar la estructura de las comunidades microbianas, se puede realizar el análisis de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), previa extracción y amplificación del ADN (Krsek y Wellington, 2006). Es posible determinar la actividad enzimática durante la degradación de la celulosa.

En resumen. Se pueden integrar todos los resultados en un modelo que contribuya a explicar mejor la actividad celulolítica del suelo y que, a su vez, nos permita diseñar un indicador de calidad de suelo sobre la caracterización de dicha actividad celulolítica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. (1981). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: AGT Editor.
- CADENAS, T. (2016). *Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación de la actividad enzimática de celulasas en suelos*. Venezuela: Centro de Investigación en Ambiente, Biología y Química (Ambioquim), Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo.
- CORTÉS ORTIZ, W., Ibla Gordillo, J., Calderón Velásquez, L. y Herrera Bueno, A. (2013). «Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de naranja y banano». *Journal of Technology*, 12(2), 72-76.
- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. España: Ed. Paraninfo.
- FRIONI, L. (1990). *Ecología microbiana del suelo*. Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de La República.
- _____ (2011). *Microbiología básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- FUENTES GODO, P.M. (1968). «Estudio de descomposición de la celulosa en placa de tierra granulada». *2ª Conferencia Latino Americana de Biología del Suelo*. Santa María, Brasil.
- Cátedra de Microbiología Agrícola (1999 y -). *Guía de trabajos prácticos*. Corrientes: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- GÓMEZ, E.L., Romero, A.E., Wall, L.G. e Iglesias, M.C. (2012). «Degradación de celulosa en lotes agrícolas bajo siembra directa» [Actas]. *XIX Congreso latinoamericano de la ciencia del suelo y XXIII Congreso argentino de la ciencia del suelo*. Mar del Plata, Argentina.
- IGLESIAS, M.C. y Gonzales Leguizamón, R. (1988). «Adaptación del método de "litter bags" para determinar la constante de degradación de la celulosa en laboratorio». *9a Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas*. Corrientes: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- KRSEK, M. y Wellington, E.M. (2006). «Studies of microbial community structure and function below ground in a managed upland grassland site at Sourhope». *Research Station Applied Soil Ecology*, 33(2), 127-136.
- LANDABURU, A.C. (1982). «Descomposición de celulosa en un pastizal natural de la depresión del Salado». *Revista de la Facultad de Agronomía*, 3(1), 51-55.
- MADIGAN, M.T., Martinko, J.M., Bender, K., Buckley, D. y Sthal, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14ª ed.) Madrid: Pearson Educación.

- METCALFE, A.C., Krsek, M.G., Gooday, W., Prosser, J.I. y Wellington, E.M.H. (2002). «Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture» *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5042-5050.
- PRAUSE, J., Lifschitz, A., Dalurzo, H.C. y Agudo, D.E. (2002). «Leaf litterfall and decomposition in a forest of the Chaco argentino». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33, 19-20, 3653-3661.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F. y Bakos, B. (1984). «Empleo de microdiscos de papel de filtro para la evaluación de la celulólisis en placa de tierra granulada». *Publicación Técnica*, 1. Resistencia, Chaco: Instituto Agrotécnico, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F., Bakos, B. y López, N.F. (1984). «La capacidad celulolítica en placas de tierra granulada de suelos dedicados a la agricultura del nordeste de la Provincia de Santa Fe y su relación con otras características de los mismos». *Publicación Técnica*, 2. Resistencia, Chaco: Instituto Agrotécnico, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste.
- QUANT BERMÚDEZ, J.F. (1969). «Descomposición de celulosa en placa de tierra moldeada» [Actas]. *5ª Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo*, 180-183.
- RAMÍREZ, P. y Cocha, J.M. (2003). «Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: isolation, characterization and cellulolytic activity determination». *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.
- SCHAEFER, R. (1971). *Estudios sobre actividad de poblaciones microbianas en suelos chilenos. Proyecto de Estudios y Reconocimiento de suelos chilenos*. Santiago, Chile: ONU-Minagri.
- VAN WESEMAEL, B. (1993). «Litter decomposition and nutrient distribution in humus profiles in some mediterranean forests in southern Tuscany». *Forest Ecology and Management*, 57, 99-114.
- WINOGRADSKY, S. (1949). *Microbiologie du sol. Problemes et methodes. Cinquante ans recherches*. Boulevard Saint-Germain, París: Masson Et Cie Editeurs.

Capítulo 3. Determinación de infección micorrícica

Marcela R. Cossoli, Amalia M. E. Romero, Amilcar Correa,
Matías H. Serafini y María C. Iglesias

Un gran número de microorganismos residen en el suelo y llevan a cabo un amplio rango de funciones. Entre estos microorganismos se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Smith y Read, 2008).

Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se producen entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas. El término micorriza proviene del griego (*mykos*: hongo y *rhiza*: raíz) y fue utilizado por primera vez por Frank (1885) para describir un fenómeno común que observó en las raíces de árboles de los bosques templados de Norteamérica.

Los hongos son seres vivos heterótrofos y, por lo tanto, se benefician con los hidratos de carbono sintetizados por la planta. A su vez, estos toman y transfieren nutrientes del suelo a la raíz (principalmente fósforo y nitrógeno) y le proveen protección contra patógenos y condiciones hídricas desfavorables (Smith y Read, 2008).

La formación de micorrizas resulta fundamental para la supervivencia de muchos taxones de plantas en diversos ecosistemas, incluyendo especies de cultivo de interés agronómico (Bethlenfalvay y Linderman, 1992).

Los hongos micorrícicos arbusculares se caracterizan por el desarrollo de hifas inter e intracelulares y estructuras de intercambio denominadas arbusculos dentro de las células corticales de la raíz, y por la producción de esporas intra y extraradicales. Además, algunas especies desarrollan vesículas dentro de las raíces (Saparrat, Ruscitti y Arango, 2020).

Bajo condiciones naturales, la mayoría de los cultivos agronómicos están colonizados con hongos micorrícico-arbusculares, y las prácticas agronómicas implican cambios complejos que podrían afectar a las poblaciones de estos hongos (Schalamuk, Druille y Cabello, 2013).

Para determinar la presencia de micorrizas y eventualmente cuantificarlas, es necesario realizar observaciones microscópicas de las raíces y es habitual utilizar diferentes protocolos de tinción de las raíces para el reconocimiento de estructuras fúngicas como proponen Phillips y Hayman (1970).

3.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método descrito se basa en la tinción de las raíces de especies vegetales y en la observación detallada de las mismas, pudiendo visualizar todas las estructuras que forman parte de una infección micorrícica.

3.2. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

Cuantificar y describir el grado de infección micorrícica que pueda existir en diferentes especies vegetales bajo diferentes condiciones, pudiendo detallar el porcentaje de presencia de cada una de las estructuras fúngicas presentes en las raíces.

3.3. EQUIPAMIENTO

Se necesitan los siguientes elementos:

- Frascos y tubos de ensayo
- Probetas
- Porta y cubreobjetos
- Microscopio óptico
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

3.4. REACTIVOS

Los reactivos que se utilizarán se detallan a continuación:

- Hidróxido de potasio 10%
- Agua oxigenada 10 vol
- Ácido clorhídrico 0,1 N
- Ácido láctico 5%
- Azul de tripán 0,05%.

3.5. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Se trabaja con raíces de las especies vegetales que se encuentren bajo objetivo de estudio, una vez que estas son extraídas del suelo, deben estar correctamente limpias, sin ninguna partícula extraña, para proceder a la tinción.

3.6. PROCEDIMIENTO

Se llevará a cabo una tinción de las raíces y posteriormente su observación microscópica.

3.6.1. Tinción de las raíces

Se trabaja con la técnica reportada por Phillips y Hayman (1970) y Frioni (2011), con modificaciones incorporadas por el equipo de la Cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE), quedando la misma con los siguientes pasos:

1. **Aclarado de las raíces con hidróxido de potasio.** Una vez que se obtienen las raíces perfectamente limpias, se las transfiere a tubos de ensayo o frascos de vidrio, luego se les incorpora hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que queden sumergidas. Se las deja reposar durante 24 o al menos 12 horas en la mesada del laboratorio. Con el transcurrir del tiempo, el KOH se torna desde amarillento hasta tomar un color café, dependiendo de la especie vegetal.
2. **Incorporación de agua oxigenada.** Transcurrido el tiempo, se descarta el KOH y se enjuagan las raíces 3 veces con agua corriente, al igual que el frasco. Es conveniente trabajar en todos estos pasos con coladores y espátulas de plástico para manipular la masa de raíces (no material de metal porque puede ser corroído por el hidróxido). Una vez enjuagadas las raíces, se les coloca agua oxigenada (H_2O_2) 10 vol o al 3% hasta que queden sumergidas y se las deja reposar durante 15 minutos.
3. **Incorporación del ácido clorhídrico.** Pasado los 15 minutos, se descarta el H_2O_2 y se enjuagan una vez las raíces con agua corriente, se las coloca nuevamente en el frasco y se les incorpora ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N hasta que queden sumergidas, dejándolas por 5 minutos.

4. Incorporación de ácido láctico y azul de tripán. Se descarta el HCl de cada frasco y sin enjuagar las raíces, se les coloca ácido láctico al 5% hasta que queden sumergidas. Luego, se les incorpora de a gotas el colorante azul de tripán, intentando lograr que el líquido quede de un color azul cristalino (Figura N° 1). Pasado un tiempo, el colorante empieza a ingresar a las raíces y comienza a teñirlas, en este momento es posible rectificar el colorante si se observa que las raíces quedan celestes. Es importante colocar de a poco el colorante debido a que, si las raíces quedan muy oscuras, se torna difícil visualizar las estructuras en el microscopio.



Figura N° 1. Detalle de las raíces sumergidas en ácido láctico y azul de tripán luego de su decoloración.

Una vez que se realiza este protocolo de tinción, las raíces se mantienen sin descomponerse a temperatura ambiente durante todo el tiempo que insuma la observación de la infección micorrízica. En el caso de disminuir el volumen de ácido por evaporación, este puede reponerse en el frasco quedando nuevamente las raíces sumergidas.

3.6.2. Observación microscópica

La observación se realiza siguiendo la técnica descrita por Giovannetti y Mosse (1980), con algunas modificaciones incorporadas por el equipo de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

En un portaobjeto se montan 10 segmentos de raíces teñidas que son tapadas con un cubreobjetos. Es importante en este punto que queden las raíces húmedas ya que, si se secan, no se puede realizar la observación bajo el microscopio.

En un costado del portaobjeto se realizan 5 marcas distanciadas a lo largo de 1 cm (Figura N° 2). Estas marcas van a señalar las 5 líneas que se van a seguir a lo largo de las 10 raíces, quedando de esta manera generados 50 puntos de observación. En cada uno se posiciona con el objetivo de 40x del microscopio y se describe en una grilla si existe la presencia de hifas, arbuscúlos y/o vesículas. De esta forma, teniendo en cuenta que cada punto se considera un 2%, podemos obtener el dato del porcentaje de cada estructura presente en una muestra en estudio. El porcentaje de micorrización total se obtiene a partir de calcular los campos donde está presente al menos una de las estructuras antes mencionadas.

Cabe aclarar que en cada uno de los 50 campos observados puede suceder que no haya ninguna estructura o que estén presentes las tres. Se considera como óptimo generar al menos 3 portaobjetos (repeticiones) por cada muestra que sea parte del ensayo en estudio, de esta forma se pueden promediar los datos y permiten un análisis estadístico.

3.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE

Tomaremos los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Ensayo en el cultivo de algodón, donde se consideró la utilización de abonos orgánicos. Estos se generaron de la mezcla con aserrín de estiércoles con diferentes orígenes: estiércol de ave, bovino, caprino y equino. Estos abonos orgánicos fueron aplicados al cultivo de algodón en 2 dosis diferentes, 20 tn.ha⁻¹ y 40 tn.ha⁻¹, con un total de 9 tratamientos incluyendo un testigo, con 5 repeticiones. El ensayo se realizó bajo condiciones controladas en invernáculo.

Luego de finalizado el ensayo, y habiendo realizado todas las determinaciones necesarias, se extrajeron las plantas de algodón y se tiñeron sus raíces. Después se determinó el porcentaje de presencia de las diferentes estructuras fúngicas en la simbiosis micorrícica.

Se detectaron diferencias en los porcentajes de las estructuras que respondían al tipo de abono y a la dosis utilizada, como también al contenido de P del suelo de cada uno de los tratamientos.

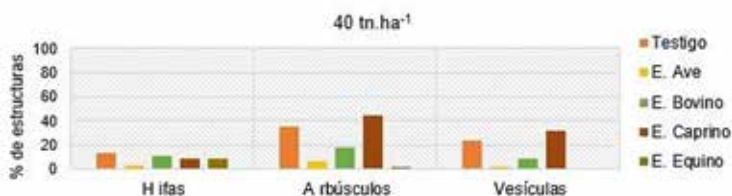


Figura N° 4. Estructuras para los tratamientos con abonos en una dosis de 40 tn.ha⁻¹.

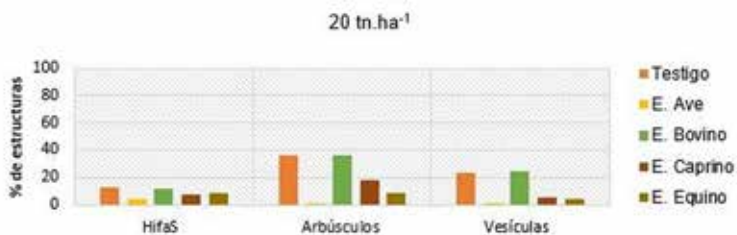


Figura N° 5. Estructuras para los tratamientos con abonos en una dosis de 20 tn.ha⁻¹.



Figura N° 6. Contenido de P del suelo de cada uno de los tratamientos del ensayo en algodón.

En la mayoría de los abonos (ave, caprino y equino) en la dosis más alta hubo mayor cantidad de P en el suelo que en la más baja, y los porcentajes de las estructuras respondieron de la misma forma. En cambio, en el abono a partir de estiércol bovino, se encontró menor contenido de P en ambas dosis y en el caso de la presencia de micorrizas, hubo mayor porcentaje de arbuscúlos y de vesículas en el tratamiento con menor dosis. Se podría decir que aquí la relación simbiótica respondió con relación al menor contenido de P.

Ejemplo 2. En este caso se trabajó en un cultivo de gramínea, específicamente con avena. Aquí el planteo del ensayo se realizó a campo y se trabajó con 8 tratamientos que provenían de la utilización de 3 biofertilizantes (*Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter* sp.) y el tratamiento testigo sin inocular. En todos ellos también se incluyó la utilización de polvo de roca basáltica, con y sin basalto.

Esta avena se muestreó en dos oportunidades, la primera fue a los 56 días de la aplicación de los tratamientos y la segunda fue luego de un pastoreo, a los 22 días de este. En cada oportunidad se extrajeron plantas con raíces que fueron teñidas según el protocolo descrito anteriormente y se verificó la infección micorrícica en el microscopio.



Figura N° 7. Presencia de hifas para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.



Figura N° 8. Presencia de arbusculos para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.



Figura N° 9. Presencia de vesículas para cada tratamiento en avena, en ambos muestreos.

En todos los casos, en el segundo muestreo se verificó un mayor porcentaje de presencia de hifas en todos los tratamientos, siendo más marcada para *Pseudomonas* y *Azotobacter* en los tratamientos con basalto.

Con respecto a los arbusculos, en la mayoría de los casos fue ligeramente menor en el segundo muestreo, exceptuando para *Pseudomonas* con basalto y *Azotobacter* sin basalto, con porcentajes superiores en el segundo muestreo. Se destaca además al *Azotobacter*, dando resultados inversos según el uso o no de basalto.

Algo muy notorio, pero quizás esperable fue la presencia de vesículas, las que de por sí fueron las estructuras que menos se visualizaron. En el segundo muestreo prácticamente no hubo o fue nula su presencia en algunos casos, lo que podría ser lógico, dado que la planta está estresada, rebrotando luego del pastoreo, y las vesículas son estructuras que almacenan sustancias de reservas como lípidos, lo que insinúa un gran gasto de energía en la simbiosis.

En resumen. Utilizando el protocolo de tinción y de observación microscópica fue posible determinar la infección micorrícica y describirla en todos sus componentes o estructuras, logrando detectar diferencias en todos los parámetros evaluados que están asociados a prácticas agrícolas utilizadas en cultivos de interés productivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETHLENFALVAY, G.J. y Linderman, J.A. (1992). *Mycorrhizae and crop productivity*. Horticultural Crops Research Laboratory. Oregon, EE.UU.: USDA-ARS.
- FRANK, B. (1885). «Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze». *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3, 128-145. Disponible en <https://bit.ly/3lvKftO>
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- GIOVANNETTI, M. y Mosse, B. (1980). «An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots». *New Phytologist*, 84(3), 489-500.
- PHILLIPS, J.M. y Hayman, D.S. (1970). «Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection». *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-161. Disponible en <https://bit.ly/3qqywGT>
- SAPARRAT, M.C.N., Ruscitti, M.F. y Arango, M.C. (2020). *Micorrizas arbusculares*. Libros de Cátedra. La Plata: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- SCHALAMUK, S., Druille, M. y Cabello, M.N. (2013). «Hongos formadores de micorrizas arbusculares. Influencia de las prácticas agronómicas sobre su diversidad y dinámica de colonización». *Rizósfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable*, 47-71.
- SMITH, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* (3a ed.) Nueva York: Academic Press.

Capítulo 4. Determinación de las proteínas del suelo reactivas a Bradford - BRSP (glomalina)

Germán L. Pérez, Andrea A. Sirio,
Cristina E. Sotelo y Sebastián Carnicer

La glomalina es una glicoproteína relacionada a los hongos micorrízicos (endomycorrizas). Los hongos micorrízicos arbusculares son microorganismos que se asocian simbióticamente a la mayoría de las plantas y se detectan a nivel de raíz. Esta relación beneficia a la planta en aspectos relacionados a la nutrición e hidratación, entre otros, y se da gracias al aumento de la superficie explorada por medio de las hifas de las micorrizas. Existen dos tipos de micorrizas: las ectomicorrizas, que se encuentran en la superficie radical, y las endomicorrizas, que se extienden en el micelio dentro del tejido radical. Esta infección es sensible a las condiciones edáficas y puede evaluarse para establecer relaciones de fertilidad y estado nutricional de la planta, como así también utilizarse como indicador ambiental. La medición de este parámetro (glomalina) puede realizarse por diferentes métodos: por el método de Bradford y por el Elisa (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), entre otros. Este parámetro es útil como indicador de manejo de suelos, ya que tiene un importante papel en su agregación y como almacén de carbono.

Las micorrizas vesículo arbusculares son microorganismos biótrofos obligados y pertenecen al *Phylum Glomeromycota*, estas especies de hongos se encuentran ampliamente distribuidas en el ecosistema terrestre y forman una relación simbiótica con más del 80% de las especies vegetales (Shüßler y Walker, 2001; He *et al.*, 2020). En esta relación, la planta otorga a las micorrizas los polisacáridos necesarios para su desarrollo y, como contraparte, estos hongos ayudan a la nutrición de las plantas al aumentar el volumen de suelo a explorar gracias a las hifas que generan (Borie y Rubio, 1999; Frioni, 2006; Grümberg *et al.*, 2010; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista edáfico o de la salud del suelo, se encontró una relación positiva entre estos microorganismos, la estabilidad de los agregados y el contenido de carbono, debido a una glicoproteína que estos organismos producen y que tiene ciertos efectos benéficos sobre algunas de las propiedades edáficas (Wright y Anderson 2000; Purin y Klauberg Filho, 2008; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Un ejemplo de estas glicoproteínas son las que Wright y Upadhyaya en 1996 denominaron glomalina, en referencia a su ocurrencia exclusiva en el orden glomales, que incluía las micorrizas arbusculares según la clasificación de *Glomeromycetes* en ese momento. Esta molécula de alta estabilidad, que está compuesta por proteínas y azúcares, tiene características recalcitrantes e hidrofóbicas. Las mismas son exudadas por las hifas de estos hongos que luego se depositan en la pared más externa de las mismas. En las raíces colonizadas y a medida que senescen, lo hacen sobre las partículas del suelo de la rizósfera. Al ser hidrofóbicas y tener características cementantes, ellas favorecen la estabilidad y el proceso de agregación del suelo y son parte del reservorio o *stock* de carbono (se acumula llegando a representar hasta el 5% del carbono total) y nitrógeno (Rillig *et al.*, 2003; González-Chávez, Gutiérrez-Castorena y Wright, 2004; Treseder y Turner, 2007; Huidobro y Pérez Brandán, 2011; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Esta molécula se encuentra fuertemente adherida tanto en la superficie como en el interior de los micro y macroagregados, logrando una vida media de entre 7 y 42 años, siendo mayor a la vida media de otros productos metabólicos de origen microbiano del suelo (Nichols, 2003; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Diversos estudios indican una relación entre estas glicoproteínas y distintas situaciones de uso o manejo del suelo, encontrando mayor concentración en los suelos en condiciones prístinas o de manejos sustentables, al compararlos con sistemas de manejo intensivo o poco conservacionista (Wright y Anderson, 2000; Purin y Klauberg Filho, 2010; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020).

Este método cuantifica la proteína del suelo relacionada con la glomalina y reacciona con el compuesto de Bradford. Esta puede extraerse del suelo o de las hifas de los hongos, obteniéndose dos fracciones según el procedimiento de extracción empleado. Para su evaluación, se divide a esta proteína en dos, la Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE), que corresponde a un material recientemente producido y depositado en el suelo y de naturaleza muy lábil, y la Glomalina Total (GT), integrada por las proteínas fuertemente unidas a las partículas del suelo, producidas y excretadas en un período de tiempo mayor (González-Chávez,

Gutiérrez-Castorena y Wright, 2004; Lovelock *et al.*, 2004; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020)¹.

Dado que esta proteína puede no solo determinarse, sino también dividir el estudio para su interpretación (GFE y GT) y su sensibilidad a las distintas situaciones de manejo del suelo, es que la cuantificación de esta proteína es un parámetro importante a la hora de evaluaciones edáficas con fines ambientales (Pérez *et al.*, 2020; Rodríguez-Yon *et al.*, 2020). Este capítulo está basado en metodologías propuestas por Wright y Upadhyaya (1996, 1998) y por Bradford (1976), con algunas modificaciones realizadas en el Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo de la Universidad Nacional del Nordeste.

4.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ensayo de Bradford (1976) se fundamenta en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 con las proteínas. La forma azul (más aniónica) del colorante, que se une a la proteína, tiene una absorbancia máxima a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína puede ser estimada por medición de la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto es usualmente alcanzado al medirse la absorbancia de la solución a 595 nm.

El colorante parece unirse más fuertemente a residuos de arginina y lisina, y en menor extensión a residuos de histidina y

1. Es menester tener presente que los términos utilizados para referirse a las distintas fracciones de glomalina deben considerarse con mucho cuidado debido a la coextracción de sustancias orgánicas que interfieren en el método de Bradford y tienen potenciales reacciones cruzadas en inmunoensayos. Por esta razón, Purin y Klauberg (2008), adaptando lo expuesto por Rilling (2004), proponen denominar las extracciones de la siguiente manera: BRSP (Proteína Total Reactiva por el Método de Bradford) en reemplazo de «glomalina total» y EE-BRSP (Proteína Reactiva Fácilmente Extraíble por el Método de Bradford) en reemplazo de «glomalina fácilmente extraíble». Esto es debido a que el método de Bradford no es específico para una única proteína. Asimismo, en el caso de determinaciones de anticuerpos, IRSP (Fracción de BRSP Reactiva al Anticuerpo Monoclonal MAb 31b11) es reemplazo de «IRTG» (Glomalina Total Inmunoreactiva) y EE-IRSP (Fracción de EE-BRSP Reactiva al Anticuerpo Monoclonal MAb 31b11) en reemplazo de «IREEG» (Glomalina Fácilmente Extraíble Inmunoreactiva). Esto es debido a que hay posibilidad de reactividad cruzada con el anticuerpo. En este capítulo se denominará solo «glomalina», pero se debe tener presente que en la determinación hay otras proteínas del suelo relacionadas.

aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina). Esta especificidad puede llevar a variaciones en la respuesta del ensayo a diferentes proteínas, siendo este su principal inconveniente.

En general, la proteína usada para construir la curva patrón debe ser la misma que la que está siendo determinada. Frecuentemente esto no es posible y la respuesta del colorante con la muestra es relativamente cuantificada como una proteína genérica. La albúmina bovina sérica es comúnmente usada como proteína estándar, porque es económica y se consigue fácilmente en su forma pura. El argumento más fuerte para el uso de esta proteína es que permite que el resultado sea comparado directamente con aquellos estudios previos que también han usado esta proteína.

El complejo proteína-colorante debe reaccionar por un determinado tiempo para que se desarrolle por completo el color. La velocidad de formación de este complejo es dependiente de la temperatura, y en la medida que la temperatura del reactivo aumenta, también aumenta la absorbancia de la mezcla ensayada. Por lo tanto, es importante que el reactivo de Bradford se encuentre a temperatura ambiente al inicio del ensayo. Sin embargo, con el tiempo se forman agregados de proteína-colorante que se vuelven precipitados visibles y que interfieren con la precisión de la medida espectrofotométrica del complejo proteína-colorante. Esto usualmente no es un problema en la primera hora luego de la adición del reactivo de Bradford, pero si un precipitado visible se ha formado antes de la medición, el ensayo debe ser repetido y la absorbancia medida antes que suceda esto nuevamente (Walker, 2009).

4.2. OBJETIVOS DE LA DETERMINACIÓN

La importancia de determinar el contenido de glomalina es que la misma está altamente relacionada con la estabilidad de los agregados, funciona como un pegamento de las partículas del suelo al mejorar la estructura e influir en la aptitud frente a la erosión y pérdida de agua.

Por otra parte, la glomalina es un reservorio de carbono del suelo, siendo esto importante a nivel ambiental. Una de sus fracciones es muy sensible a los cambios en el manejo de los agroecosistemas, lo que le confiere aptitudes como indicador biológico.

Actualmente, hay interés por correlacionar los niveles de glomalina en el suelo con otros parámetros físico-químicos y biológicos, existiendo aún pocos estudios al respecto.

La cuantificación de proteína es una técnica rápida, objetiva, barata y relativamente fácil de realizar.

4.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

Los siguientes reactivos, materiales y equipos son necesarios para cada etapa de la determinación de la Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) y Glomalina Total (GT):

4.3.1. Confección y la curva patrón

Para la confección de la curva patrón, son necesarios los siguientes reactivos, materiales y equipos:

- *Reactivos*: albúmina bovina, reactivo de Bradford y agua destilada y/o desionizada.
- *Materiales*: matraz aforado (50 ml), tubos de ensayo (7 o más), vasos de precipitados (4) y tips (0,1, 1 y 5 ml).
- *Equipos*: micropipetas automáticas (0,1, 1 y 5 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.2. Extracción de Glomalina Fácilmente Extraíble (GFE) y Glomalina Total (GT)

Se requieren los siguientes materiales y equipos:

- *Materiales*: tamiz (2 mm), tubos tipo Falcon (15 ml), tubos tipo Falcon (50 ml), probeta graduada (10 ml), tubos Eppendorf (1,5 ml), papel aluminio y cesto metálico para tubos.
- *Equipos*: balanza analítica de precisión, autoclave, centrífuga (3500 rpm), micropipetas automáticas (5 y 10 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.3. Lectura de las muestras

Se requieren los siguientes reactivos, materiales y equipos:

- *Reactivos*: reactivo de Bradford y agua destilada y/o desionizada.
- *Materiales*: tubos de ensayo (7 o más), vasos de precipitados (4) y tips (0,1, 1 y 5 ml).
- *Equipos*: micropipetas automáticas (0,1, 1 y 5 ml), espectrofotómetro y cubetas de vidrio o cuarzo.

4.3.4. Recomendaciones preanalíticas

Las recomendaciones son las siguientes:

- a. **Condiciones ambientales del lugar de trabajo y medidas de seguridad del personal de laboratorio.** El trabajo de laboratorio debe realizarse con adecuada luz y ventilación.

Se debe usar guardapolvo, guantes, barbijo y gafas protectoras.

b. **Acondicionamiento del material de laboratorio.** Lavado de todo el material con agua corriente 3 veces y 1 vez con destilada.

c. **Preparación de las muestras de suelo para el análisis.** Se deben seguir los siguientes pasos:

c.1. Una vez la muestra de suelo llega al laboratorio, se seca al aire colocándola en una bandeja plástica sobre la mesada con ambiente ventilado, luego es molida con mortero y pilón de porcelana, y tamizada por malla de 2 mm (tamiz N° 10).

c.2. Las muestras de suelo, una vez acondicionadas, se colocan en recipientes limpios de plástico o bolsas resistentes. Si no se analizarán en el corto tiempo, se recomienda guardarlas refrigeradas a 4 °C.

4.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación, se detallarán las soluciones necesarias y los pasos para alcanzar la concentración y características requeridas.

Sodio citrato 20 mM (para preparar una solución de 1000 ml, Figura N° 1) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) o ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):

1. Calcular la cantidad necesaria de sodio citrato según se encuentre o no hidratado (1 mM de sodio citrato anhidro son 258,06 mg; en el caso de sodio citrato 2-hidrato, serían 294,06 mg) para preparar una solución de 20 mM.
2. Disolver, una vez pesado, un poco en un vaso de precipitado, se lleva con ayuda de un embudo y se trasvasa a un matraz.
3. Llevar a volumen con agua destilada (matraz de 1000 ml).
4. Verificar que la solución tenga pH 7,00 (corregir con un ácido o base según corresponda).

Sodio citrato 50 mM (para preparar una solución de 1000 ml) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) o ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):

1. Calcular la cantidad necesaria de sodio citrato según se encuentre o no hidratado (1 mM de sodio citrato anhidro son 258,06 mg; en el caso de sodio citrato 2-hidrato, serían 294,06 mg) para preparar una solución de 50 mM.

2. Disolver, una vez pesado, un poco en un vaso de precipitado, se lleva con ayuda de un embudo y se trasvasa a un matraz.
3. Llevar a volumen con agua destilada (matraz de 1000 ml).
4. Verificar que la solución tenga pH 7,00 (corregir con un ácido o base según corresponda).

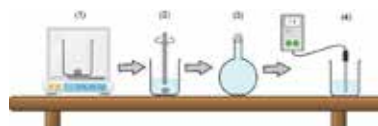


Figura N° 1. Preparación de las soluciones de sodio citrato.

Tabla N° 1. Composición del reactivo de Bradford

<u>Reactivo</u>	<u>Cantidad</u>
Agua desionizada	hasta 1000 ml
Azul de Coomassie G-250	100 mg
Ácido fosfórico 85%	100 ml
Etanol 95%	50 ml

Para su preparación, realizar los siguientes pasos:

1. Disolver en un matraz el azul de Coomassie con el etanol.
2. Agregar el ácido fosfórico con cuidado (reacción exotérmica).
3. Llevar a volumen en un matraz de 1 litro con agua desionizada.
4. Enrasar, esperando, en caso de que sea necesario, la desaparición de la espuma que suele generar al agregar agua.

El reactivo se debe filtrar con papel de filtro Whatman N° 1 y luego almacenarlo en una botella color caramelo en la heladera. Es estable por varias semanas. Antes de usar, sacarlo a temperatura ambiente. Durante el período que el colorante esté guardado, puede precipitar, por lo que debe filtrarse antes de usar.

Solución stock de albúmina. Se pesan 50 mg de albúmina bovina (esta se conserva en heladera a 4 °C), se lleva a un matraz aforado de 50 ml y se enrasa con agua destilada.

- Agregar el agua por las paredes del matraz, evitando la formación de espuma, ya que luego esta tarda en desaparecer.
- Anotar la fecha de preparación de los reactivos.
- Guardar en la heladera.

4.5. PROCEDIMIENTO

A continuación, se detallarán los pasos a seguir para la extracción y determinación de la BRSP.

4.5.1. Confección de la curva patrón y lectura de muestras

Para comenzar, realizaremos un curva patrón a la que referir los valores obtenidos de las muestras:

1. Tomar con la pipeta volúmenes por triplicado de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μl de una solución madre de albúmina de 1 mg/ml de concentración en tubos de ensayo (la absorbancia de una solución de albúmina bovina de concentración 1 mg/ml es de aproximadamente 0,60, ver Tabla N° 2) para la curva de calibración.
2. Llevar a un volumen final de 100 μl con agua destilada.
3. Pipetear en un tubo 100 μl de agua destilada como blanco.
4. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma, que lleva a una baja reproducibilidad.
5. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.

Tabla N° 2. Proporciones de los reactivos para realizar la curva patrón y la concentración de la proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en cada dilución

	Blanco	P1	P2	P3	P4	P5	P6
H ₂ O destilada (μl)	100	90	80	60	40	20	--
Patrón (μl)	--	10	20	40	60	80	100
Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	10	20	40	60	80	100
Reactivo de Bradford	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

La curva de calibración no es lineal, y las absorbancias precisas varían dependiendo del tiempo del reactivo de Bradford (desde su preparación). Consecuentemente, es esencial construir una curva de calibración para cada ensayo.

En la Figura N° 2 vemos un ejemplo con el R² y la ecuación de la recta.

1. Usar cubetas plásticas (descartables) o de vidrio, que deben estar limpias y libres de detergente. No deberían usarse cubetas de cuarzo, ya que el reactivo de Bradford se une a este material e interfiere en el ensayo. Trazas de colorante que se encuentren en vidrio o plástico pueden removerse con lavados con metanol o soluciones de detergente.
2. Lavar la cubeta con etanol entre las tandas de lecturas (se va coloreando con el reactivo).
3. Usar siempre el mismo reactivo de Bradford para las determinaciones de las muestras y la curva patrón; si se termina y se prepara otra solución, se debe volver a determinar la curva patrón.
4. Colocar papel de diario en la mesada donde se trabaja porque el reactivo de Bradford mancha al realizar las lecturas en el espectrofotómetro.

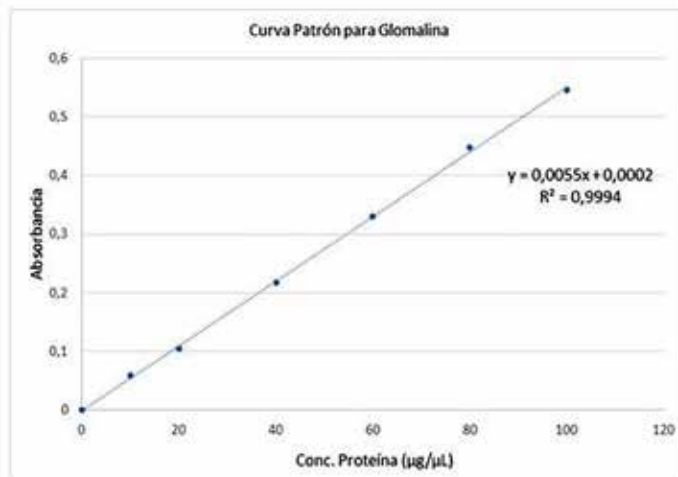


Figura N° 2. Ejemplo de curva patrón relacionando concentraciones de proteína y absorbancia.

4.5.2. Procedimiento de extracción y medición de glomalina

Para la extracción de glomalina, se procede según el siguiente esquema:

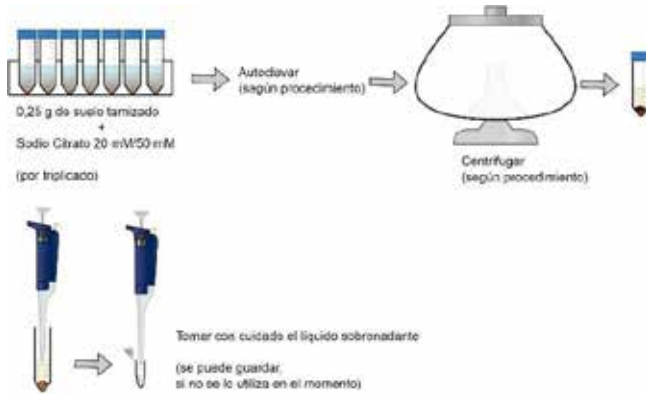


Figura N° 3. Esquema para la extracción de glomalina.

En la determinación de glomalina se realiza el procedimiento descrito a continuación:

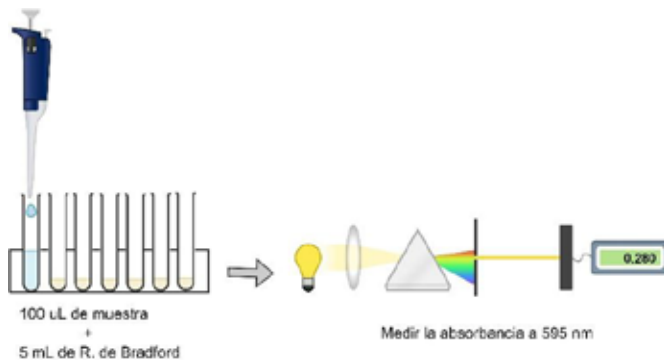


Figura N° 4. Esquema para la determinación de glomalina.

4.5.3. Extracción y determinación GFE

Una vez secadas las muestras de suelo al aire, los pasos son:

1. Pesar 0,25 g de suelo en un tubo plástico de 15 ml, por triplicado por muestra.
2. Agregar 2 ml de citrato de sodio 20 mM (con el pH verificado) a cada tubo.
3. Agregar un tubo como blanco, sin suelo, solo con citrato de sodio.
4. Cubrir con papel aluminio cada tubo o con la tapa floja.

5. Autoclavar 30 minutos a 121 °C y 1 atm.
6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente. La solución obtenida tendrá una coloración marrón, cuya intensidad estará relacionada a la cuantificación.
7. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos. La centrifugación es solo para formar un pellet de suelo y puede hacerse entre 3000-10000 xg.
8. Sacar el sobrenadante y colocarlo en un Eppendorf de 1,5 ml (se puede guardar a 4°C hasta una semana).
9. Pipetear en un tubo de ensayo 100 µl de la muestra problema.
10. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma.
11. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.

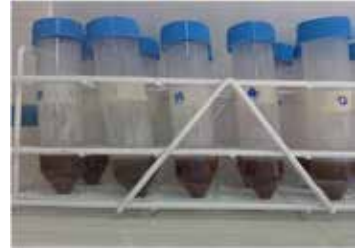


Figura N° 5. Tubos Falcon con suelo y citrato de sodio luego de un ciclo de autoclavado.

4.5.4. Extracción y determinación GT

A partir de las muestras de suelo secas al aire, se procede de la siguiente manera:

1. Pesar 0,25 g de suelo en un tubo plástico de 15 ml, por triplicado por muestra.
2. Agregar 2 ml de citrato de sodio 50 mM (con el pH verificado) a cada tubo.
3. Agregar un tubo como blanco, sin suelo, solo con citrato de sodio.
4. Cubrir con papel aluminio cada tubo o con la tapa floja.
5. Autoclavar 60 minutos a 121 °C y 1 atm.
6. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
8. Medir el volumen del líquido sobrenadante en una probeta graduada de 10 ml.
9. Guardar a 4 °C (en heladera) en tubos Falcon de 50 ml.
10. Volver a colocar 2 ml de citrato de sodio 50 mM en el tubo con suelo anteriormente autoclavado.
11. Repetir los puntos del 6 al 10 hasta que el extracto quede transparente, de manera que se pueda observar fácilmente a través de él. Los extractos de una muestra se van recolectando en el mismo tubo Falcon de 50 ml.
12. Pipetear en un tubo de ensayo 100 µl de la muestra problema.
13. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford a cada tubo, mezclar bien por inversión o suavemente vorterearlo. Evitar la formación de espuma.

14. Medir la absorbancia a 595 nm, luego de los 5 minutos de agregado el reactivo y antes de los 60 minutos.

4.6. CÁLCULOS

Para realizar los cálculos, pasar los valores de las lecturas de la curva a Excel siendo: el eje «y» correspondiente a las lecturas de absorbancia a 595 nm y el eje x, la concentración de albúmina en μg (ver Figura N° 2). Luego, hacer el gráfico de dispersión y agregar línea de tendencia, presentar ecuación del gráfico y el valor de R^2 (que deberá ser 0,99 o superior).

De la ecuación $a+bx$ se despeja «x» y queda: $x = \frac{y-a}{b}$

Esos valores obtenidos de concentración (μg) corresponden a 100 μL de extracto, calcular para los ml totales de extracto:

$$\text{Proteína } \frac{\mu g}{\mu L} = \frac{\text{Abs}_{595nm} - a}{b}$$

Donde: y es la lectura de la absorbancia, a es la ordenada al origen y b es la pendiente.

$$\text{Proteína } \left(\frac{\mu g}{\mu g \text{ suelo}} \right) = \left(\frac{\text{Proteína } \left(\frac{\mu g}{\mu L} \right) * Ve}{Vp * 250000} \right) * 4$$

Donde: Ve es el volumen (μL) de solución de extracción y Vp , el volumen (μL) de solución problema.

Finalmente, convertir la unidad para expresarlo en $mg.g^{-1}$ de suelo.

En resumen. Esta determinación es una herramienta que puede ayudar a poner en evidencia los efectos de disturbios ambientales en la vida del suelo asociada a la actividad de hongos micorrízicos arbusculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORIE, F. y Rubio, R. (1999). «Effects of arbuscular-mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of Aluminum -tolerant and Aluminum-sensitive barley cultivars». *Journal of Plant Nutrition*, 22, 121-137.
- BRADFORD, M.M. (1976). «A rapid and sensitive Method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding». *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- DA SILVA SOUSA, C., Menezes, R., Simões, C., Valadares de Sá Barretto Sampaio, E. y De Sousa Lima, F. (2012). «Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos». *Semina: Ciências Agrárias*, 33(1), 3033-3044. [Consulta 2 de junio de 2021]. Disponible en <https://bit.ly/3L4y9cP>
- FRIONI, L. (2006). *Microbiología. Básica, ambiental y agrícola*. Uruguay: Ediciones Universidad de la República Montevideo.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.A., Gutiérrez-Castorena, M.C. y Wright, S. (2004). «Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad». *Terra Latinoamericana*, 22(4), 507-514.
- GRÜMBERG, B., Conforto, C., Rovea, A., Boxler, M., March, G., Luna, C., Meriles, J. y Vargas Gil, S. (2010). «La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz». *Información Agronómica*, 47. Disponible en <https://bit.ly/3qpsjLa>
- HE, J.D., Chi, G.G., Zou, Y.N., Shu, B., Wu, Q.S., Srivastava, A.K., y Kuča, K. (2020). «Contribution of glomalin- related soil proteins to soil organic carbon in trifoliolate orange». *Applied Soil Ecology*, 154, 103592. Doi:10.1016/j.apsoil.2020.103592
- HUIDOBRO, J. y Brandán, C.P. (2011, abril 18-20). «Niveles de glomalina y estabilidad de agregados del suelo, en distintos sistemas de manejo de tabaco en el Valle de Lerma, Salta» [Actas]. *Congreso Nacional de Ecología y Biología de Suelos*. Mar del Plata, Buenos Aires.
- LOVELOCK, C.E., Wright, S.F. y Nichols, K.A. (2004). «Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil». *Soil Biology and Biochemistry*, 36(6), 1009-1012.
- NICHOLS, K. (2003). *Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi*. PhD dissertation. College Park, MD: University of Maryland.
- PÉREZ, G.L., Sotelo, C.E., Sirio, A.A., Carnicer, S., Mansilla, N.P., Fernández, C., López, Castelán, M.E. (2020). «Análisis comparativo de suelos cultivados y de monte de la provincia del Chaco, Argentina». *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 40(2), 91-101.
- PURIN, S. y Klauberg Filho, O. (2010). «Glomalina: nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrizicos arbusculares».

- En Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N. y Tsai, S.M. (eds.) *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil* (pp. 503-524). Brasil: Lavras, Ufla.
- RILLIG, M.C. (2004). «Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation». *Canadian Journal Soil Science*, 84, 355-363.
- RILLIG, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F. y Torn, M.S. (2001). «Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils». *Plant Soil*, 233, 167-177.
- RILLIG, M.C., Ramsey, P.W., Morris S. y Paul E.A. (2003). «Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change». *Plant Soil*, 253, 293-299.
- RODRÍGUEZ-YON, Y., Chiriboga-Morocho, R., Concha-Egas, T.G. y De León-Lima, D.P. (2020). «Caracterización de las fracciones de glomalina en suelos Ferralíticos Rojos con diferente uso». *Cultivos Tropicales*, 41(4), e04. E-pub 01 de diciembre de 2020. Recuperado en 10 de junio de 2021. Disponible en <https://bit.ly/3Jzad15>
- SHÜSSLER, A. y Walker, Ch. (2010). *The Glomeromycota: species list with new families and new genera*. Disponible en <https://bit.ly/3L4lNBv> Último acceso 10 de junio de 2021.
- TRESEDER, K.K. y Turner, K.M. (2007). «Glomalin in Ecosystems». *Soil Science Society of American Journal*, 71, 1257-1266. Disponible en <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0377>
- WALKER, J.M. (2009). *The Protein Protocols Handbook*. Cap. 4 The Bradford Method for Protein Quantitation (3a ed.) EE.UU.: Ed. Springer. Disponible en <https://bit.ly/3N88odA>
- WRIGHT, S.F. y Upadhyaya, A. (1996). «Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi». *Soil Science*, 161, 575-586.
- WRIGHT, S.F. y Upadhyaya, A. (1998). «A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi». *Plant Soil*, 198, 97-107.
- WRIGHT, S.F. y Anderson, R.L. (2000). «Aggregat estabily and glomalin in alternative croprotations for the central Great Plains». *Biology and Fertility of Soils*, 31, 249-253. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s003740050653>

Capítulo 5. Nitrógeno mineralizado en anaerobiosis (Nan). Método de incubación anaeróbica

Silvia A. Arzuaga, Cristina E. Sotelo,
Stella M. Contreras Leiva y Marcela Toledo

Las formas orgánicas de nitrógeno (N) constituyen hasta el 90% del N total en la capa arable de los suelos minerales. A pesar de la gran cantidad de N que se encuentra en el suelo, se estima que solo del 1 al 3% del total del N orgánico es mineralizado (Keeney y Nelson, 1982). Su transformación a formas asimilables por las plantas es uno de los aspectos de mayor importancia desde el punto de vista productivo, económico y ambiental.

En ambientes frágiles, zonas áridas, semiáridas y subhúmedas, el N proviene de la mineralización del N orgánico, los residuos de las cosechas, enmiendas orgánicas, además del N inorgánico residual de años anteriores, en tanto que en ambientes templados y húmedos lo hace casi con exclusividad del N que se mineraliza durante la temporada de cultivo (St. Luce *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2018).

La mayoría de las estimaciones de la contribución de N por mineralización del suelo se basa en las incubaciones aeróbicas durante largos períodos (Stanford y Smith, 1972). Estos procedimientos de incubación aeróbica proporcionan condiciones óptimas de temperatura, humedad y aireación para la población microbiana responsable de la mineralización del N orgánico del suelo en la mayoría de las condiciones de campo. La principal desventaja de los procedimientos aeróbicos es la dificultad de mantener un contenido óptimo de agua en el suelo durante la incubación. Una segunda desventaja es la necesidad de medir las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- después de la incubación.

Se han propuesto numerosos índices que posibilitan la estimación de la disponibilidad de N a partir de análisis químicos y biológicos, sencillos y que demandan poco tiempo (Keeney y Nelson, 1982; Griffin, 2008), pero solo algunos han brindado resultados

satisfactorios. Existen otros métodos para estimar la cantidad de N que puede ser liberada de la materia orgánica (MO) mediante el balance de masa de N, como los métodos de campo de Meisinger (1984) y de García y Davedere (2007).

Waring y Bremner (1964) propusieron un procedimiento de incubación anaeróbica como una alternativa más simple y rápida a las incubaciones aeróbicas. Realizar la incubación en condiciones de anegamiento elimina la necesidad de establecer y mantener un contenido estándar de agua del suelo durante la incubación. Otra ventaja es que se evita la nitrificación y todo el N mineralizado durante la incubación estará en forma de NH_4^+ . La mineralización se produce en condiciones anaeróbicas, y la inmovilización puede reducirse en comparación con las condiciones aeróbicas debido a la reducción de la eficiencia energética, ya que el carbono (C) no se oxida completamente a CO_2 . Esta diferencia en la eficiencia energética no cambia fundamentalmente la mineralización de N (Drinkwaters *et al.*, 1996).

La determinación del contenido de N-NH_4^+ producido en incubación anaeróbica (Nan) sería un indicador confiable para estimar el aporte de N por mineralización, dado que se correlaciona estrechamente con el N potencialmente mineralizable (Npm) (Soon, Haq y Arshad, 2007). El Npm es la fracción del N orgánico considerada como una estimación estandarizada de la mineralización potencial del suelo (Curtin y Campbell, 2008 citado por Martínez *et al.*, 2016). Según Fabrizzi, Morón y García (2003), las incubaciones anaeróbicas de suelo (Nan) son importantes debido a la sensibilidad del método para observar cambios que se producen en el suelo debido al manejo. Además, sus valores se asemejan a los obtenidos por incubaciones aeróbicas de largo plazo, por lo que el Nan ha sido propuesto como el mejor indicador del N potencialmente mineralizable (Martínez *et al.*, 2018).

Para el sudeste bonaerense, Echeverría, Bergonzi y Ferrari (2000) obtuvieron una estrecha correlación entre el Nan y el Npm, y destacaron la ausencia de problemas relacionados con el ajuste a condiciones óptimas de humedad durante la incubación y el bajo requerimiento de aparatos y reactivos (Benintende *et al.*, 2007). Es interesante mencionar que el corto período de incubación de las muestras de suelo (7 días a 40 °C) respecto a otras metodologías representa una gran ventaja y facilita su utilización como método de rutina. Dada la sencillez de su determinación, su sensibilidad a los cambios a mediano y largo plazo producidos por el uso del suelo, y su relación con algunos procesos del suelo como el suministro de N, el Nan coincide con las características requeridas para ser utilizado como indicador de calidad, salud del suelo (Doran y Parkin, 1994; Domínguez *et al.*, 2016).

El conocimiento sobre la fracción de nitrógeno de la materia orgánica, susceptible a la mineralización, puede ayudar a optimizar el manejo de fertilizantes nitrogenados (Franzluebbers, 2016). Martínez *et al.* (2018), aplicando el indicador biológico Nan, detectaron que es el método que mejor explica la mineralización de N, pero sugieren que para mejorar el ajuste de este indicador sería apropiado incluirlo en regresiones múltiples con otros índices y parámetros tanto edáficos como climáticos. En los suelos del sudeste bonaerense estudiados por estos autores, las fracciones granulométricas tienen gran importancia en los procesos de mineralización del suelo.

Según Reussi-Calvo *et al.* (2014), la incorporación del Nan a los modelos tradicionales de diagnóstico de N en trigo permitió mejorar la estimación del rendimiento del testigo y la exportación de N en grano, respecto de utilizar solo N-NO_3^- como indicador de la fertilidad nitrogenada. Con esta información desarrollaron un modelo para predecir la respuesta a N y la dosis de N en función de la suma de las precipitaciones durante el ciclo del trigo, el rendimiento del testigo y el Nan, sugiriendo que el modelo debería ser validado para otras regiones productoras de trigo.

5.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La mineralización del nitrógeno es el proceso bioquímico mediante el cual los microorganismos del suelo obtienen la energía necesaria para realizar sus procesos metabólicos. El mismo se realiza mediante la ruptura de los enlaces de las macromoléculas orgánicas para transformarlos en amoníaco (NH_3^+) o ion amonio (NH_4^+).

Se distinguen dos procesos en la mineralización: la amonificación y la nitrificación. En la amonificación actúan innumerables grupos de bacterias, hongos, actinomicetes, protozoos y algas, siendo un proceso sin especificidad de sustratos ni microorganismos. Es por eso que las condiciones ambientales son diversas y se puede producir amonificación tanto en aerobiosis como anaerobiosis. Ese amoníaco que queda disponible en este proceso lo utilizan como sustrato de microorganismos específicos para la nitrificación, que se realiza únicamente en aerobiosis (Frioni, 1999).

Waring y Bremner (1964) también propusieron un método biológico para estimar el Npm, que se basa en una incubación anaeróbica corta a 40 °C, metodología que ha sido recomendada luego por autores como Gianello y Bremner (1986). El N-NH_4^+ , producido durante un corto período anaeróbico de incubación (Nan), es extractado con cloruro de potasio (ClK) y luego destilado. Esta

destilación es recogida en ácido bórico más indicador, para luego determinar el N-NH_4^+ de la muestra por medio de una tritación con ácido sulfúrico diluido (exactamente valorado). Es importante mencionar además que, para conocer el valor del Nan (Gianello y Bremner, 1986; Mulvaney, 1996), hay que realizar la extracción del nitrógeno inicial (N-NH_4^+ del suelo sin incubar). La diferencia entre ambos permitirá determinar el nitrógeno orgánico mineralizado anaeróbicamente (Nan), proveniente de la materia orgánica lábil.

Esta variable Nan ha sido propuesta como un estimador rápido y preciso de Npm, ya que existe una alta correlación entre ellos (Echeverría *et al.*, 2000; Soon, Haq y Arshad, 2007).

5.2. Objetivo de la determinación

La determinación del nivel de nitrógeno mineralizado en el suelo puede proporcionar una estimación del nitrógeno disponible del mismo. Se lo puede definir como la fracción del nitrógeno orgánico convertido a formas disponibles para las plantas –o minerales– bajo condiciones específicas de temperatura, humedad, aireación y tiempo. En particular, el nitrógeno mineralizado en condiciones de anaerobiosis (Nan) es utilizado para conocer cuánto del nitrógeno orgánico es transformado a NH_4^+ (Waring y Bremner, 1964).

El objetivo de aplicar el método de mineralización anaeróbica del nitrógeno (Nan) es conocer de manera eficiente, rápida y económica el nitrógeno que se mineraliza a partir de la materia orgánica lábil. Es decir, aquel nitrógeno aportado por descomposición inmediata de los restos de cultivo y material orgánico incorporados al suelo. El Nan constituye una valiosa información que puede formar parte de modelos de fertilización, de manera tal de ajustar con la mayor exactitud posible las recomendaciones de fertilización nitrogenadas. En este capítulo se describe la metodología aplicada para determinar el nitrógeno mineralizable anaeróbicamente (Nan). Se detallan los pasos en el protocolo que sigue.

5.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

La metodología para determinar el Nitrógeno anaeróbico (Nan) se basa en el método propuesto por Waring y Brenmer (1964), modificado por Kenney y Nelson (1982), y se necesita:

- Tamiz de 2 mm.
- Recipientes con tapón hermético, tubos de centrifuga tipo Falcon con pollerita de 100 ml.
- Balanza analítica (precisión).
- Estufa para incubación.
- Agitador oscilatorio.
- Balón de destilación de 100 ml.
- Pipeta automática de 5 y 10 ml.
- Equipo de destilación tipo Kjeldahl.
- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 50 ml.
- Microbureta de titulación con precisión de 0,01 ml.
- Agitador orbital para titulación.
- Centrifuga (3500 rpm).

5.4. REACTIVOS PROANÁLISIS

Los reactivos necesarios son los detallados a continuación:

- Agua destilada
- Cloruro de potasio (ClK)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Solución indicadora de ácido bórico más mezcla de indicadores
- Ácido sulfúrico
- Verde de bromocresol
- Rojo de metilo
- Etanol
- Ácido bórico
- Azul de bromotimol.

5.5. CONDICIONES AMBIENTALES DEL LUGAR DE TRABAJO Y MEDIDAS DE SEGURIDAD DEL PERSONAL DE LABORATORIO

El trabajo de laboratorio debe realizarse con adecuada luz y ventilación, y el proceso de destilación, bajo campana de extracción de gases por el uso de álcalis concentrados como NaOH 10 N.

Se debe usar guardapolvo, guantes, barbijo y bajo la campana, protección para los gases y gafas protectoras.

5.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL DE LABORATORIO

El material de laboratorio debe ser lavado con agua destilada o desionizada, además de realizar el calibrado de la estufa a 40 °C.

5.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO PARA EL ANÁLISIS

Una vez la muestra de suelo llega al laboratorio, se seca al aire, colocándola en una bandeja plástica sobre la mesada con ambiente ventilado. Luego, es molida con mortero y pilón de porcelana, y tamizada por malla de 2 mm (tamiz N° 10). Posteriormente, las muestras de suelo, una vez acondicionadas, se colocan en recipientes limpios de plástico o bolsas resistentes.

5.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación, se detallan cada una de las soluciones a preparar.

Cloruro de potasio (ClK) 2 N: disolver 150 g de ClK p.a. en 1000 ml de H₂O destilada (preparar en matraz con aforo).

Cloruro de potasio (ClK) 4 N: disolver 300 g de ClK p.a. en 1000 ml de H₂O destilada (preparar en matraz con aforo). La disolución de los 300 g de ClK se realiza en un vaso de precipitado agregando el agua destilada caliente lentamente y revolviendo continuamente, hasta lograr la disolución total (en aproximadamente 900 ml). Se coloca en un matraz aforado de 1000 ml, se deja enfriar y luego se afora con agua destilada.

Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N: su preparación conlleva una reacción exotérmica, con liberación de vapores irritantes, por lo que debe realizarse bajo campana de extracción de gases. La disolución de los 400 g de NaOH se realiza en un vaso de precipitado agregando no más de 800 ml de agua destilada lentamente y revolviendo de manera continua, hasta lograr la disolución total. Se trasvasa aun matraz aforado de 1000 ml, se deja enfriar y se afora.

Mezcla de indicadores: disolver 0,300 g de verde de bromocresol y 0,165 g de rojo de metilo en 500 ml de etanol (Keeney y Nelson, 1982).

Solución de ácido bórico más indicadores: colocar 40 g de ácido bórico p.a. (H₃BO₃) en un vaso de precipitado de 2 litros y agregar 40 ml de la mezcla de indicadores. Agitar hasta la disolución

completa, medir el pH y ajustar a 5 con el agregado de NaOH 0,01 N. Se trasvasa a un matraz de 2 litros y se afora.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,01 N valorado: para obtener ácido sulfúrico 0,01 N, exactamente valorado, cuyo factor de corrección es incorporado en los cálculos (Fc), se debe previamente preparar las soluciones de biftalato de potasio 0,01 N, hidróxido de sodio 0,01 N y H₂SO₄ 0,01 N, para luego valorar esta última.

Solución de biftalato de potasio 0,01 N: pesar 1,02 g de biftalato de potasio (KHC₈H₄O₄), PM 204,22 secado en estufa a 103 °C durante 2 o 3 horas. Transferir la sal a un matraz de 500 ml, agregar agua destilada, disolver y llevar a volumen. Mezclar bien.

Solución de hidróxido de sodio 0,01 N: tomar una alícuota de 1 ml de NaOH 10 N y llevar a 1000 ml. Tomar una alícuota de 5 ml en un Erlenmeyer (hacerlo por triplicado) y agregar 30 ml de agua destilada. Titular con biftalato de K 0,01 N preparado en el punto anterior, usando fenolftaleína como indicador, el cual vira de color rosa a transparente.

Cálculo de la normalidad del NaOH

$$NR = \frac{\text{normalidad del biftalato de K} \cdot \text{vol. gastado de biftalato}}{\text{alícuota del NaOH}}$$

Por ejemplo:

$$NR = \frac{0,01 \text{ N del biftalato} \cdot 5,186 \text{ ml de biftalato}}{5 \text{ ml NaOH}} = 0,010373 \approx 0,01038$$

$$Fc_1 = \frac{NR}{NT} = \frac{0,01038}{0,01} = 1,03$$

Donde: Fc₁ es el factor de corrección de la normalidad del NaOH, NR es la normalidad real del NaOH y NT es la normalidad teórica del NaOH.

Solución de H₂SO₄ 0,01 N: tomar 100 ml de una solución de H₂SO₄ 0,1 N y llevar a 1000 ml en un matraz. Tomar una alícuota de 5 ml (hacerlo por triplicado). Agregar 30 ml de agua destilada. Titular con el NaOH 0,01 N estandarizado usando fenolftaleína como indicador (pasa de transparente a rosa).

Cálculo de la normalidad del ácido sulfúrico

$$NR = \frac{\text{normalidad NaOH} \cdot Fc_1 \cdot \text{vol. gastado de NaOH}}{\text{Alícuota de H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,01 N}}$$

Volvemos al ejemplo

$$NR = \frac{0,01 N * 1,03 * 4,85}{5 \text{ ml}} = 0,099 \approx 0,01N$$

$$Fc_2 = \frac{NR}{NT} = \frac{0,0099}{0,01} = 0,99$$

Donde: Fc_2 es el factor de corrección del ácido H_2SO_4 valorado, NR es la normalidad real u obtenida a partir de la titulación del H_2SO_4 y NT es la normalidad teórica o esperada del H_2SO_4 .

5.9. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE HUMEDAD DEL SUELO

Las muestras de suelo tamizadas son llevadas a estufa a 105 °C hasta peso constante (entre 24 y 48 horas), con esto se saca el contenido de humedad del suelo seco a estufa (H expresado en %) y con ello se obtiene el factor de corrección (Fc), que es utilizado para corregir los valores obtenidos en el análisis. Las fórmulas de H (%) y Fc de la humedad de suelo se presentan en la sección de cálculos (2).

5.10. PROCEDIMIENTO

El procedimiento se divide en tres partes: determinación de nitrógeno inicial del suelo, determinación de nitrógeno incubado y determinación de Nan por diferencia entre el N incubado y el N inicial del suelo.

5.10.1. Determinación de nitrógeno inicial (N inicial)

Para determinar el contenido de $N-NH_4^+$ inicial en las muestras, se pesan 5 g de suelo seco al aire, se agregan 30 ml de CLK 2 N, se agita 1 hora y luego se toma una alícuota que se destila por arrastre de vapor y se cuantifica el $N-NH_4^+$ titulando con un ácido débil.

Pasos a seguir:

a. Obtención del extracto de la muestra:

1. Utilizar una balanza de precisión, pesar 5 g de suelo en un tubo de centrifuga tipo Falcon (con pollerita) de 100 ml, previamente tarado (Figura N° 1).
2. Agregar al suelo 30 ml de CLK 2 N y cerrar el tubo herméticamente.

3. Agitar durante 1 h, ubicando los tubos de manera horizontal (acostados) en un agitador oscilatorio a 125 rpm.
4. Centrifugar durante 6 minutos a 2800 rpm.

De acuerdo a la finalidad del análisis, se puede realizar la extracción de la muestra por duplicado.

b. Destilación del extracto:

1. Preparar el equipamiento para realizar la destilación (destilador por arrastre de vapor, Figura N° 2), se enciende el extractor de gases de la campana, la luz y luego el interruptor del destilador. Se toman todas las medidas necesarias usando una máscara adecuada para tal fin. Se realiza la limpieza del sistema con H₂O destilada (mientras este llega a la temperatura de inicio del análisis), colocando en el balón de destilación 25 ml de agua destilada y haciendo correr esta por todo el sistema. Se recolecta en un Erlenmeyer la destilación y con unas gotas de BTA (Azul de bromotimol) se controla el pH, cuando el color es amarillo (pH ácido), indica que el sistema está limpio.
2. Tomar una alícuota de 10 ml del extracto con una pipeta automática y se introduce en un balón de destilación de 100 ml más 25 ml de H₂O destilada.
3. Luego, previo a introducir el balón en el destilador, agregar 3 ml de NaOH 10 N, a fin de alcalinizar el medio, para lograr que todo el N-NH₄⁺ sea arrastrado por el vapor de H₂O.
4. Se conecta el matraz al sistema de destilación y se produce el arrastre de todo el NH₄⁺ liberado en el proceso.
5. El destilado de la muestra problema se recibe en un Erlenmeyer de 50 ml que contiene una mezcla de 5 ml de ácido bórico más indicadores. Se destila hasta llegar al aforo de 25 ml, donde con las primeras gotas del destilado comienza el cambio de color, virando de borravino a verde brillante. Este paso, la destilación, se realiza por duplicado. Destilar dos blancos. Los mismos se realizan con 10 ml de ClK 2 N más 25 ml de agua destilada, más 3 ml de NaOH 10 N.

c. Titulación del extracto:

1. El extracto de color verde brillante, producto de la destilación recibido en ácido bórico, es titulado con un ácido débil (proceso de tritación). Para la titulación, se emplea una solución de H₂SO₄ 0,01 N, exactamente valorada (según se



Figura N° 1. Balanza de precisión.



Figura N° 2. Destilador por arrastre de vapor.

explica en la sección de preparación de reactivos). Esta es colocada en una microbureta (Figura N° 3) y es acompañada por un agitador rotatorio, magnético.

2. Se comienza la titulación colocando el imán en el Erlenmeyer que contiene el extracto, prestando atención al punto final que se observa cuando el color verde vira con una gota a un rosa opaco (Figura N° 4).

5.10.2. Determinación de nitrógeno incubado

Las incubaciones anaeróbicas se realizan colocando 5 g de suelo tamizado por 2 mm en tubos de centrifuga, se agregan 15 ml de H₂O destilada, se tapan herméticamente para mantener la anaerobiosis y se llevan a estufa durante 7 días a 40° C, metodología propuesta por Waring y Brenner (1964). Después del tiempo de incubación, se agregan 15 ml de CLK 4 N, se centrifuga y del sobrenadante se toma una alícuota para realizar una microdestilación por arrastre de vapor (Kenney y Nelson, 1982), obteniendo como resultado el N-NH₄⁺ de incubación. Pasos a seguir:

a. Obtención del extracto de la muestra:

1. Pesar 5 g de suelo en un tubo de centrifuga tipo Falcon (con pollerita) de 100 ml, previamente tarado.
2. Agregar 15 ml de H₂O destilada y tapar con tapón hermético a fin de conservar la anoxia.
3. Incubar en estufa a 40 °C durante 7 días. Sacar los tubos de la estufa.
4. Agregar 15 ml de CLK 4 N y tapar los tubos.
5. Agitar durante 1 hora a 125 rpm (oscilatorio).
6. Centrifugar durante 6 minutos a 2800 rpm.

b. Destilación del extracto:

Para realizar este paso, se siguen las indicaciones descriptas anteriormente en la destilación del extracto obtenido para el N inicial (A.2-).

c. Titulación del extracto:

Para realizar este paso, al igual que anteriormente, se sigue lo indicado en la titulación del extracto para el N inicial del suelo (B. 2-).

Destilar dos blancos. Los mismos se realizan con 10 ml de CLK 2 N más 25 ml de agua destilada, más 3 ml de NaOH 10 N.



Figura N° 3. Bureta semiautomática con agitador magnético.



Figura N° 4. Cambio de coloración al titular el extracto destilado con H₂SO₄ 0,01 N.

5.10.3. Determinación de nitrógeno anaeróbico (Nan)

El Nan se determina por la diferencia entre el $N-NH_4^+$ producido durante la incubación y la cantidad de $N-NH_4^+$ inicial del suelo.

5.11. CÁLCULOS

Las fórmulas para calcular el nitrógeno inicial, incubado y anaeróbico son las siguientes:

N inicial y N incubado del suelo. La fórmula empleada para calcular el N inicial y el N incubado del suelo es la siguiente:

$$\% \text{ de N} = \frac{(P - B) * N * F_{c_2} H_2SO_4 * Vd * 100 * 0,014 * fc}{g \text{ de suelo} * \text{alícuota}}$$

Donde: P son los ml de H_2SO_4 gastados en el problema, B son los ml de H_2SO_4 gastados en el blanco, N es la normalidad del ácido, F_{c_2} es el ácido sulfúrico (H_2SO_4), factor de corrección del ácido valorado, Vd es el volumen de dilución, 0,014 son los meq del N, Alícuota es la cantidad de extracto del problema destilado y fc, el factor de corrección de humedad de suelo seco a estufa (105 °C).

Contenido de humedad de la muestra:

$$\%H = \frac{[(ph - ps)] * 100}{ps}$$

Factor de corrección a partir de la humedad del suelo seco al aire:

$$fc = \frac{100}{100 - H}$$

Donde: fc es el factor de corrección de humedad, H es el porcentaje de humedad de suelo seco al aire, ph es el peso del suelo húmedo y ps, el peso del suelo seco.

Nitrógeno anaeróbico del suelo (Nan). El Nan se calcula por diferencia entre el $N-NH_4^+$ producido durante la incubación por siete días y la cantidad de N inicial del suelo.

$$Nan (\%) = N \text{ incubado} (\%) - N \text{ inicial} (\%)$$

Y multiplicando por 10000, el porcentaje de N mineralizado de forma anaeróbica queda expresado en $mg \text{ kg}^{-1}$ de suelo.



Figura Nº 5. Estufa de incubación.

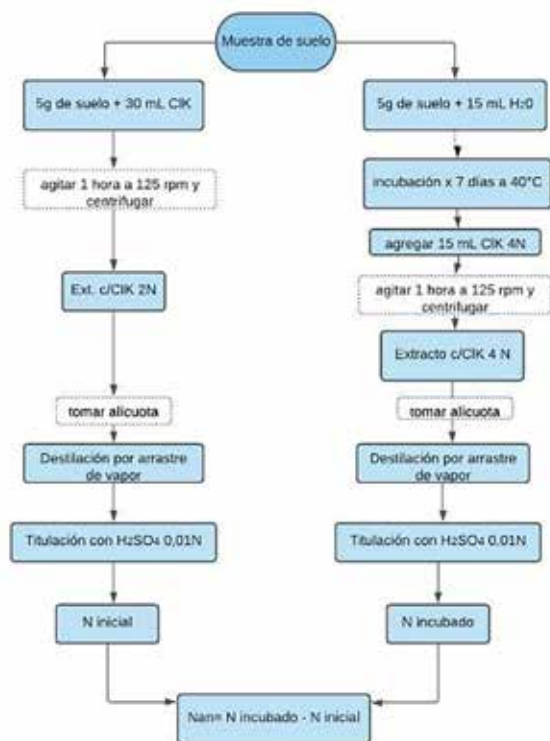


Figura N° 6. Diagrama de flujo para la determinación del nitrógeno anaeróbico (Nan).

Esta metodología es ampliamente utilizada en nuestro país. En las Tablas N° 1 y 2 se muestran valores hallados en distintos trabajos de investigación.

Tabla N° 1. Valores de nitrógeno anaeróbico (Nan) en distintos órdenes de suelos, cultivos y manejos

Prof. (m)	Uso	Rango	Nan mg kg ⁻¹	Orden de suelo
0-0,10	Agrícola-Citrus	53 a 343	89	Oxisol (Misiones) ¹
0-0,10	Agrícola- Labranza Convencional-Maíz		40	Oxisol (Misiones) ²
0-0,10	Agrícola -LC-Té		50	Oxisol (Misiones) ³

0-0,20	Agrícola		≈62	Sur-Este de Pcia. de Bs. As. (diferentes sitios)
0-0,20	Agrícola	12 a 260		Pcia. de Bs. As. (6556 muestras de suelos) ⁵
0-0,05	Experimento 2		≈89	Molisol (Entre Ríos) ⁶
	Agrícola-Soja/Soja		≈100	
	Agrícola Soja/Maíz		≈98	
0-0,05	Experimento 3		≈98	Vertisol (Entre Ríos) ⁷
	Agrícola-Soja/Soja		≈108	
	Agrícola Soja/Maíz		≈131	
0-0,10	Selva subtropical		157	Oxisol (Misiones) ⁸
0-0,10	Forestal-Pinus sp.		47	Oxisol (Misiones) ⁹
0-0,20	Agrícola-Siembra Directa	25 a 99	≈52	Molisol (Buenos Aires) ¹⁰
0-0,10	Forestal-Pinus sp.		30	Inceptisol (Corrientes) ¹¹
	Referencia-Pastizal		100	
0-0,20	Suelos pseudo-prístinos	88 a 141		Suelos (Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y Córdoba) (n=125) ¹²
	Suelos agrícolas	57 a 80		
0-0,05	Forestal-Acacias		426	Molisol (Balcarce, Bs. As.) ¹³
	Pastizal natural		235	
	Agricultura continua		80	
0-0,05	Pseudo-prístino	63 a 334	184	Molisol (Sudeste de Buenos Aires) ¹⁴
	Agrícola continuo	51 a 138	93	
0,05-0,20	Pseudo-prístino	29 a 142	80	Molisol (Sudeste de Buenos Aires) ¹⁵
	Agrícola continuo	25 a 84	52	

¹ Dalurzo, Toledo y Vásquez (2005). ² Toledo *et al.* (2013). ³ Toledo *et al.* (2013).

⁴ Reussi Calvo *et al.* (2013). ⁵ Reussi Calvo *et al.* (2014). ⁶ Gregorutti *et al.* (2014).

⁷ Gregorutti *et al.* (2014). ⁸ Toledo *et al.* (2018). ⁹ Toledo *et al.* (2018). ¹⁰ Martínez *et al.* (2018). ¹¹ Acosta *et al.* (2020). ¹² Rivero *et al.* (2020). ¹³ Rodríguez *et al.* (2015).

¹⁴ García *et al.* (2020). ¹⁵ García *et al.* (2020).

Tabla N° 2. Valores medios de Nitrógeno anaeróbico (Nan) determinados en suelos de la Provincia del Chaco bajo distintos usos

Profundidad	Uso	Nan (mg kg ⁻¹)	Tipo de suelo
0-0,05 m	Referencia-Monte	109	
0,05-0,10 m	Referencia-Monte	48	
0-0,05 m	Agrícola-siembra directa	32	Molisoles
0,05-0,10 m	Agrícola-siembra directa	23	
0-0,05 m	Silvopastoril-Gattonpanic	71	
0,05-0,10 m	Silvopastoril-Gattonpanic	29	
0-0,10 m	Monte	165	
0,10-0,20 m	Monte	68	
0-0,10 m	Chacra mixta	78	Natrustol típico
0,10-0,20 m	Chacra mixta	33	
0-0,10 m	Chacra agrícola	31	
0,10-0,20 m	Chacra agrícola	26	

En resumen. El indicador biológico Nan, resultado de la diferencia entre el nitrógeno inicial y el obtenido luego de una incubación anaeróbica del suelo, es uno de los métodos más utilizados para la determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable. Su importancia se basa en que explica muy bien la mineralización del nitrógeno, siendo un método confiable, rápido y sencillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M.G.L., Toledo, D.M., Contreras Leiva S.M. y Galantini J.A. (2020, octubre 13-16). «Relaciones de estratificación e índices de calidad de suelo en forestaciones con Pinus sp.» [Actas]. *XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. «Suelos: Desafíos para una producción y desarrollo sustentables». Corrientes, pp. 213-219.
- BENINTENDE, M.C., Benintende, S.M., Sterren, M.A., Musante, C., Saluzzio, M. y De Battista, J.J. (2007). «Modelo para estimar la capacidad de aporte de nitrógeno del suelo». *Agriscientia*, XXIV (2), 97-101.

- CAMPBELL, C.A., Jame, Y.W., Akinremi, O.O. y Cabrera, M.L. (1996). «Adapting the potentially mineralizable N concept for the prediction of fertilizer N requirement». En Ahmad, N. (ed.) *Nitrogen economy in tropical soils*. EE.UU.: Kluwer Academic Publisher.
- CURTIN, D. y Campbell, C. A. (2008). «Mineralizable nitrogen». En Carter, M.R. y Gregorich, E.G. (eds.). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (pp. 599-606). Boca Ratón, Florida, EE.UU.: CRC Press.
- DALURZO, H.C., Toledo, D.M. y Vazquez, S. (2005). «Parámetros químicos y biológicos en Oxisoles con uso citrícola». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 23(2), 159-165.
- DOMÍNGUEZ, G.F., García, G.V.M., Studdert, G.A., Agostini, M.A., Tourn, S.N. y Domingo, M.N. (2016). «Is anaerobic mineralizable nitrogen suitable as a soil quality/health indicator?» *Spanish Journal of Soil Science*, 6(2).
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assessing soil quality». En Doran, J.W. *et al.* (ed.) *Defining soil quality for a sustainable environment* (pp. 3-21). SSSA Special Publ. 35. Madison, Wisconsin: SSSA and ASA.
- DRINKWATERS, L.E., Cambardella, C.A., Reeder, J. y Rice, C. (1996). «Potentially mineralizable nitrogen as an indicator of biologically active soil nitrogen». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Methods for Assessing Soil Quality* (pp. 217-229). Special Publication 49. EE.UU.: Soil Science Society of America.
- ECHEVERRÍA, H.E., San Martín, N. y Bergonzi, R. (2000). «Métodos rápidos de estimación del nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos». *Ciencia del Suelo*, 18, 9-16.
- FABRIZZI, K., Morón, A. y García, F. (2003). «Soil carbon and nitrogen organic fractions in degraded vs. Non-degraded Mollisols in Argentina». *Soil Science Society of American Journal*, 67, 1831-1841.
- FRANZLUEBBERS, A.J. (2016). «Should Soil Testing Services Measure Soil Biological Activity?» *Agricultural & Environmental Letters*, 1(1).
- FRIONI, L. (1999). *Procesos microbianos*. Río Cuarto, Córdoba: Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- GARCÍA, F.O. y Daverede, I. (2007). «Diagnóstico para recomendación de fertilización nitrogenada en cultivos de interés económico». En Yamada, T., Abadía, S. y Vittí, G. (eds.) *Nitrogenio e enxofre na agricultura brasileira* (pp. 277-320). Piracicaba, São Paulo, Brasil: Ipn Brasil.
- GARCÍA, G.V., Wyngaard, N., Reussi Calvo, N.I., San Martino, S., Covacevich, F. y Studdert, G.A. (2020). «Soil survey reveals a positive relationship between aggregate stability and anaerobically mineralizable nitrogen». *Ecological Indicators*, 117. Disponible en <https://bit.ly/3DO811V>

- GIANELLO, C. y Bremner, J.M.A. (1986). «Simple chemical method of assessing potentially available organic nitrogen in soil». *Communication in Soil Science Plant Analysis*, 17, 195- 236.
- GREGORUTTI, V.C., Novelli, L.E., Melchiori, R.J.M., Ormaechea, M.V. y Caviglia, O.P. (2014). «Nitrógeno incubado en anaerobiosis y su relación con el nitrógeno orgánico en diferentes fracciones». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 32(1), 41-51.
- GRIFFIN, T.S., Honeycutt, C.W., Albrecht, S.L., Sistani, K.R., Torbet, H.A., Wienhold, B.J., Woodbury, B.L., Hubbard, R.K. y Powell, J.M. (2008). «Nationally-coordinated evaluation of soil nitrogen mineralization rate using a standardized aerobic incubation protocol». *Communication in Soil Science Plant Analysis*, 39, 257-268.
- KEENEY, D.R. y Nelson, D.W. (1982). «Nitrogen-Inorganic Forms». En Page, A.L. (ed.) *Methods of Soil Analysis, Agronomy Monograph 9. Part 2* (2a ed., pp. 643-698). Madison, WI: ASA, SSSA.
- MARTÍNEZ, J.M., Galantini, J.M., Duval, M. y López, F. (2016). «Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable: Una metodología simple y rápida» [Actas]. *XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo*. Río Cuarto, Córdoba.
- MARTÍNEZ, J.M., Duval, M.E., Landriscini, M.R., López, F.M. y Galantini, J.A. (2018). «Balance de nitrógeno para el cálculo de la dosis de fertilizante en trigo». En *Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida* (pp. 122-127). Disponible en: <https://bit.ly/3GBdtHe>
- MARTÍNEZ, J.M. y Galantini, J.A. (2018). «Nitrógeno del suelo: desde la materia orgánica al cultivo». En Galantini, J.A. (ed.) *Siembra directa en el SO Bonaerense* (pp. 7-12). Buenos Aires: autor.
- MARTÍNEZ, J.M., Galantini, J.A. y Duval, M.E. (2018). Contribution of nitrogen mineralization indices, labile organic matter and soil properties in predicting nitrogen mineralization. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(1), 73-89. Disponible en <https://bit.ly/3pYHAls>
- MEISINGER, J.J. (1984). «Evaluating plant-available nitrogen in soil-crop systems». En Hauck, R.D. (ed.) *Nitrogen in crop production* (pp. 391-441). Madison, Wisconsin: ASA.
- MULVANEY, R.L. (1996). «Nitrogen-Inorganic forms». En Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T. y Sumner, M.E. (eds.) *Methods of Soil Analysis. Chemical Methods* (pp. 1123-1184). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America. Disponible en <https://bit.ly/3s5Aga6>
- PAGE, A.L., Miller, R.H. y Keeney, D.R. (1982). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.

- REUSSI-CALVO, N., Sainz-Rozas, H., Echeverría, H. y Berardo, A. (2013). «Contribution of anaerobically incubated nitrogen to the diagnosis of nitrogen status in spring wheat». *Agronomy Journal*, 105, 1-8. Disponible en <https://bit.ly/3llwqcR>
- REUSSI-CALVO, N., Studdert, G.A., Calandroni, M.B., Diovisalvi, N.V., Cabria, F.N. y Berardo, A. (2014). «Nitrógeno incubado en anaerobiosis y carbono orgánico en suelos agrícolas de Buenos Aires». *Ciencia del Suelo*, 33, 189-196.
- RIVERO, C., Wyngaard, N., Crespo, C., Bassi, L., Angelini, H., Larrea, G. y Sainz Rozas, H. (2020). «Cambio en el potencial de mineralización de nitrógeno por la agricultura en la región pampeana» [Actas]. *XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Suelos: desafíos para una producción y desarrollo sustentables*. Corrientes, Argentina, pp. 1128-1133.
- RODRÍGUEZ, S., Videla, C. del C., Zamuner, E.C., Picone, L.I., Pose, N.N. y Maceira, N.O. (2015). «Cambios en propiedades químicas de un suelo molisol de la región pampeana argentina con diferente historia de manejo». *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia*, 31(2), 137-148. Disponible en <https://bit.ly/3oNZPKF>
- SOON, Y.K., Haq, A. y Arshad, M.A. (2007). «Sensitivity of Nitrogen Mineralization Indicators to Crop and Soil Management». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38, 15-16, 2029-2043. Disponible en <https://bit.ly/3dlt8Zo>
- ST. LUCE, M., Whalen, J.K., Ziadi, N. y Zebarth, B.J. (2011). «Nitrogen dynamics and indices to predict soil nitrogen supply in humid temperate soils». *Advance in Agronomy*, 112, 55-102.
- STANFORD, G. y Smith, S.J. (1972). «Nitrogen Mineralization Potentials of soils». *Soil Science Society of American Proceedings*, 36(3), 465-472.
- TOLEDO, D.M., Galantini, J.A., Ferreccio, E., Arzuaga, S., Gimenez, L. y Vazquez, S. (2013). «Indicadores e índices de calidad en suelos rojos bajo sistemas naturales y cultivados». *Revista de la Ciencia del Suelo (Argentina)*, 31(2), 201-212.
- TOLEDO, D.M., Arzuaga, S.A., Galantini, J.A. y Vazquez, S. (2018). «Indicadores e índices biológicos de Calidad de suelo en sistemas forestales». *Ciencia del Suelo*, 36, 1-12.
- WARING, S.A. y Bremner, J.M. (1964). «Ammonium production in soil under waterlogged condition as an index of nitrogen availability». *Nature*, 201, 951-952. Disponible en <https://bit.ly/3GUTe7N>

Técnicas moleculares para evaluar
la comunidad microbiana
del suelo

PARTE 4

Capítulo 1. Técnicas moleculares para evaluar la comunidad microbiana del suelo

Daniel H. Grasso y Mónica M. Collavino

Los estudios sobre muestras de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) extraídos y purificados de suelo estiman que un gramo de suelo comprende entre 2000 y 18 000 genomas procariotas distintos (Torsvik y Ovreas, 2002). Si bien la proporción es discutida, es sabido que la mayoría de estas poblaciones microbianas son recalcitrantes al cultivo en los medios y condiciones corrientemente utilizadas en el laboratorio (Schloss y Handelsman, 2003). Esta afirmación, ampliamente comprobada, establece la limitación de las herramientas de microbiología clásica a la hora de aplicarlas en la evaluación de la diversidad e incluso en las propiedades funcionales de la comunidad microbiana en ecosistemas complejos.

Los análisis de diversidad microbiana utilizando procedimientos independientes del cultivo se basan en el análisis de componentes celulares cuya diversidad se corresponda con las de las células que los contienen, pudiendo ser ácidos nucleicos, ácidos grasos o proteínas (Thies, 2015). En los estudios realizados utilizando los ácidos nucleicos y en particular el ADN para el análisis de la diversidad microbiana, se enfocan en regiones del genoma que han demostrado ser valiosas para la clasificación taxonómica, tales como los genes ADNr 16S en bacterias y *Archaea* o ADNr 18S en *Eucarya* (Chelius y Triplett, 2001; Liles *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Hoshino *et al.*, 2020).

Para el análisis de grupos funcionales de interés, tales como fijadores de nitrógeno, desnitrificadores y nitrificantes, los estudios se dirigen a regiones del genoma (genes) implicados en esas funciones (v.g. *nifH*, *amoA*, *pmoA*, *nirK*) (Braker *et al.*, 2000; Pester *et al.*, 2012; Collavino *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2018). Alternativamente, los genes y genomas de un ambiente particular (metagenomas) pueden ser secuenciados directamente mediante secuenciación masiva al azar para posteriormente obtener una anotación funcional de los mismos mediante la

comparación con bases de referencia (Rothberg y Leamon, 2008; Berg *et al.*, 2020).

La amplificación de regiones específicas del ADN utilizando el procedimiento de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite la detección de secuencias de ADN que se encuentran en pequeñas cantidades en las muestras ambientales; sin embargo, se alteran las proporciones de los componentes. Es decir, se pueden determinar los componentes de la población (taxones), pero no la proporción real (bias por PCR) en que se encuentran (Polz y Cavanaugh, 1998; Acinas *et al.*, 2005).

El análisis de la diversidad de los amplicones se realiza por secuenciación (directa o indirecta a partir de clones de bibliotecas) o por procedimientos que ponen de manifiesto esa diversidad de secuencia. A continuación, se describen dos de estas metodologías, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) y *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) (ver Figura N° 1), así como protocolos que pretenden ser asequibles en términos económicos (de costos y tiempo), incluyendo la extracción de ADN, la amplificación del mismo y el análisis de los amplicones, a fin de ser aplicados para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas de suelo por métodos no cultivables.

Se recomienda fuertemente diseñar una apropiada estrategia de muestreo, dado que en estos procedimientos se utiliza una pequeña cantidad de muestra de suelo (aprox. 2 g) para el análisis, la que en muchos casos deberá representar hectáreas de suelo. Otro aspecto importante a considerar es el transporte y conservación de las mismas para preservar la biología, la que es muy dinámica y perturbable en comparación con la química. Ambos aspectos (muestreo y conservación) se abordan en el capítulo 1 de este libro.

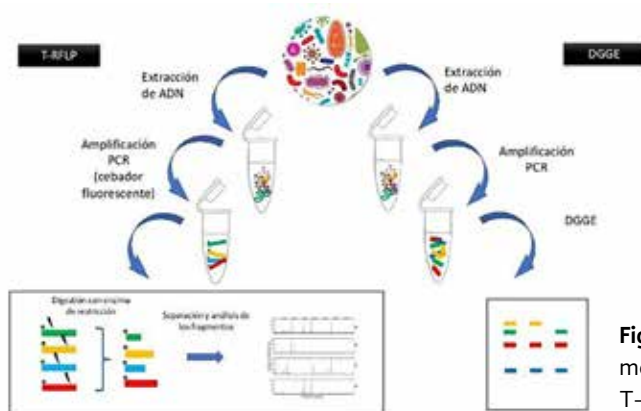


Figura N° 1. Etapas de las metodologías DGGE y T-RFLP.

1.1. OBJETIVO DE LA DETERMINACIÓN

En este capítulo se describen protocolos que pretenden ser asequibles en términos económicos (de costos y tiempo), a fin de ser aplicados para el estudio de comunidades microbianas de suelo por métodos no cultivables, incluyendo la toma de muestra de suelo, la extracción de ADN, la amplificación del mismo y el análisis de los amplicones por dos metodologías: DGGE y T-RFLP.

1.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE SUELO

Las técnicas para la extracción de ácidos nucleicos usualmente implican una combinación de métodos físicos y químicos que hacen posible la ruptura de las células tratando de minimizar el daño causado a los ácidos nucleicos. La lisis celular puede ser posterior a la separación de las células microbianas de la muestra (lisis indirecta o fraccionamiento celular) o realizarse directamente en una suspensión amortiguada de la muestra (lisis directa). Luego de la lisis celular, los ácidos nucleicos liberados son separados y purificados de los otros componentes orgánicos e inorgánicos de la muestra. El rendimiento y calidad del ADN extraído depende del procedimiento de extracción y también del tipo de suelo empleado. Algunos de los problemas que pueden afectar la eficiencia de la extracción son la unión del ADN a ciertos componentes del suelo, principalmente a la materia orgánica o a las arcillas, la lisis diferencial de las células microbianas o la coextracción con otros compuestos como ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, sales o proteínas (ver algunas revisiones de métodos de extracción: Yeates *et al.*, 1998; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Lakay, Botha y Prior, 2007; Inceoglu *et al.*, 2010). Existen numerosos procedimientos empleados corrientemente en la extracción del ADN del suelo y varios kits comerciales disponibles, incluyendo PowerSoil® DNA Isolation kit (MoBio Laboratories) y FastDNA® SPIN kit for Soil (MP Biomedicals). A fin de integrar los estudios metagenómicos, numerosos estudios han intentado proponer un único y eficiente protocolo de extracción de ADN de suelo, lo que se dificulta principalmente debido a la diversidad de suelos (Dineen *et al.*, 2010; Philippot *et al.*, 2010; Plassart *et al.*, 2012; Paul, Basu y Sarkar, 2014).

El protocolo de extracción que describimos a continuación es el descrito por Zhou, Bruns y Tiedje (1996) con ligeras modificaciones. Este método, económico y eficiente, es uno de los más aplicados y

fue utilizado con éxito en diferentes tipos de suelo, lo que hace posible la comparación con resultados previos. En el primer paso de la lisis agregamos una modificación adaptada del protocolo descrito por Devi *et al.* (2015) que nos ha permitido aumentar la concentración del ADN recuperado de algunas muestras de suelo.

1.2.1. Materiales

Los materiales necesarios son los siguientes:

- Polvo de vidrio: en un mortero perfectamente limpio, moler un trozo de vidrio (borosilicato) previamente lavado (proveniente, por ejemplo, de material de laboratorio roto) hasta obtener un polvo fino, alicuotar en tubos tipo Falcon de 15 ml (cantidad aproximada 10 g) y autoclavar. Es importante el uso de máscara y guantes protectores cada vez que se prepare o use el polvo de vidrio.
- Buffer de extracción: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM fosfato de sodio (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 1% CTAB.
- Proteinasa K (10 mg/ml).
- SDS 20%.
- Alcohol isopropílico.
- Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, vol/vol).
- Tris 10 mM (pH 8,0).

Es recomendable preparar las soluciones poco antes de ser usadas, a fin de evitar precipitados o contaminaciones.

1.2.2. Procedimiento

Se deben realizar los siguientes pasos:

1. Mezclar en un mortero 2 g de suelo con 2 g de polvo de vidrio estéril, moler por 5 minutos. Es importante usar máscara y guantes protectores.
2. Agregar a la mezcla 6,75 ml de buffer de extracción (BE) y 50 μ l de proteinasa K (10 mg/ml), mezclar pipeteando.
3. Trasvasar a un tubo Falcon de 15 ml, agitar a 250-300 rpm por 30 minutos a 37 °C.
4. Agregar 750 μ l de 20% SDS e incubar a 65 °C en baño maría por 2 h (invertir suavemente cada 15 o 20 minutos).
5. Centrifugar a 6000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, recolectar el sobrenadante.
6. Extraer el pellet de suelo dos veces más agregando 1 ml de BE y 125 μ l de SDS 20%, vortear e incubar a 65 °C por 10 minutos, centrifugar igual que en el paso previo.

7. Juntar los sobrenadantes, llevar a tubo Falcon de 50 ml y agregar igual volumen cloroformo/alcohol isoamílico.
8. Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Llevar sobrenadante a tubos Eppendorf de 2 ml, agregar isopropanol 0,6 volúmenes, mezclar, dejar 20 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 16000 g durante 20 minutos.
11. Lavar el sedimento con etanol 70°.
12. Resuspender en 200 µl totales de buffer Tris 10 mM (ejemplo, si se dividió en 4 tubos, 50 µl por tubo).
13. Determinar la concentración y pureza del ADN extraído por espectrofotometría midiendo su absorbancia a 260 nm y la relación 260nm/280nm, respectivamente. La integridad del ADN puede ser visualizada por electroforesis en gel de agarosa: 0,8% en tampón TBE (tris-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M) con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y utilizando un transiluminador UV.
14. Conservar el ADN así preparado a -20 °C.

1.2.3. Rendimiento

De acuerdo a lo publicado por Zhou, Bruns y Tiedje (1996), con este protocolo se obtiene hasta 26,9 µg de ADN por g de suelo. En nuestra experiencia hemos obtenido entre 2 y 10 µg de ADN por g de suelo, dependiendo del tipo de suelo.

1.3. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DE SUELO: DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE) Y TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP)

A pesar de que es posible obtener información filogenética precisa de los microorganismos que componen un consorcio microbiano mediante el secuenciamiento masivo de su genoma, su costo aún es elevado y limita el análisis de múltiples muestras, obstaculizando el análisis de la dinámica microbiana en las diferentes condiciones fisicoquímicas y/o biológicas del suelo. En este sentido, la aplicación de técnicas de huellas genéticas (*fingerprinting*), como DGGE, *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE) (Muyzer, 1999) o *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) (Schwieger y Tebbe, 1998), permiten el análisis simultáneo de múltiples muestras en forma rápida y de relativo bajo costo. Otras metodologías han incorporado sistemas de secuenciación automatizados para la detección láser de fragmentos de ADN

marcados con fluoróforos, por ejemplo, T-RFLP (Liu *et al.*, 1997), análisis de la heterogeneidad de genes amplificados por PCR (Ritchie *et al.*, 2000) o *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Wikström, 1999). Numerosas publicaciones han demostrado la utilidad de estas técnicas en investigaciones ecológicas que requieran seguimiento de comunidades en el tiempo o en múltiples tratamientos experimentales (v.g. Bissett *et al.*, 2009; Giebler *et al.*, 2013; Orlewska *et al.*, 2018). Estudios recientes muestran que los métodos DGGE, C/RFLP, PRACS, T-RFLP y ARISA presentan resultados comparables para evaluar la estructura microbiana (Van Dorst *et al.*, 2014; Samarajeewa *et al.*, 2015).

Es importante resaltar que todas las técnicas de tipo huella digital presentan desvíos asociados a la amplificación por PCR y suelen presentar una baja cobertura. En este sentido, Muyzer *et al.* (1993) indican como regla general considerar que el DGGE no detecta los grupos presentes en una proporción menor al 1% del *pool* total presente en una muestra. Otras limitantes adicionales son la variabilidad entre geles o corridas, la baja resolución debido a la obtención de fragmentos de igual tamaño (T-RFLP) o la comigración de fragmentos de diferente secuencia (DGGE) que pueden resultar de grupos filogenéticos muy distintos (Osborn *et al.*, 2000).

1.3.1. DGGE

Desde que Muyzer, De Waal y Uitterlinden (1993) la adoptaron para su aplicación en estudios microbiológicos, la técnica de PCR-DGGE se ha utilizado en el análisis de la composición microbiana general, incluyendo virus y microorganismos eucariotas, por lo que actualmente es una herramienta bien establecida y muy versátil (Nakatsu, 2007).

Fragmentos de ADN de igual tamaño comigran en un campo eléctrico; sin embargo, presentan una migración diferencial cuando lo hacen a través de un gradiente desnaturizante, dado que la condición de desnaturización del ADN es dependiente de la secuencia del mismo. Este principio es el fundamento del procedimiento DGGE. Si amplificamos una región genómica a partir de un metagenoma, los fragmentos obtenidos serán una combinación de fragmentos de igual tamaño, pero con variaciones en su secuencia según el grado de conservación de esa región en los componentes del microbioma. Utilizando el procedimiento DGGE es posible separar esos fragmentos, y la diversidad de bandas obtenidas representa la diversidad genómica de la región en estudio en el microbioma. Asimismo, el análisis permite la selección de bandas/especies que pueden ser escindidas, reamplificarse y

secuenciarse para su identificación taxonómica. Alternativamente, la técnica de *fingerprinting* se ha aplicado como análisis exploratorio de múltiples muestras para posteriormente acoplarse con el clonado y secuenciamiento de las muestras seleccionadas (Green *et al.*, 2009).

Esta técnica se ha aplicado a numerosos genes, tanto ribosomales (16S ARNr y 18S ARNr) como funcionales, utilizando cebadores universales o específicos, permitiendo el análisis de la diversidad de los tres dominios, Bacteria, Archaea y Eucarya, así como de grupos específicos y de vías metabólicas particulares, en diferentes muestras ambientales (Heuer *et al.*, 1997; Kowalchuk *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2011; Pereira e Silva *et al.*, 2013).

1.3.1.1. Fundamento del método

Los fragmentos de ADN de la misma longitud, pero de diferente secuencia, pueden ser separados de acuerdo a sus propiedades de fusión. Los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis en un gradiente lineal desnaturizante (de urea y formamida) a una temperatura elevada constante (60 °C a 65 °C) permanecen como doble cadena hasta alcanzar la condición de desnaturización del dominio de menor temperatura de fusión. En ese punto se produce un cambio conformacional de la molécula que provoca la disminución de la movilidad. Para evitar la desnaturización completa del fragmento de ADN, se agrega una secuencia rica en Guanina y Citosina (GC-clamp de 40-45 pb) al extremo 5' del primer *forward* (Myers *et al.*, 1985).

1.3.1.2. Protocolo

El protocolo aquí descrito es el que utilizamos corrientemente en nuestro laboratorio. Se describen los pasos necesarios para analizar por DGGE los fragmentos resultantes de amplificar un fragmento correspondiente a las regiones V3-V5 del gen 16S ARNr, utilizando los cebadores universales para bacteria 341F-GC/907R (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer *et al.*, 1998), uno de los pares más ampliamente utilizados para el análisis de la comunidad microbiana. Se describen las condiciones de desnaturización (gradiente óptimo) y electroforesis (tiempo de corrida, voltaje) descritas para estos cebadores por Green *et al.* (2009). Para la aplicación de otros cebadores, se sugiere consultar las instrucciones del manual de Bio-Rad Laboratories, *The DCode™ Universal Mutation Detection System* (1996), así como la página en línea y su guía de ayuda disponible en <http://ddgehelp.blogspot.com/> (Green *et al.*, 2009). Algunas de las imágenes que a continuación se muestran fueron extraídas de los catálogos de compra de Bio-Rad o del correspondiente manual.

1.3.1.3. Equipamiento específico

Se necesitan los siguientes equipos:

- DCode™ Universal Mutation Detection System de Bio-Rad (ver Figura N° 2)
- Fuente de electroforesis
- Vasos comunicantes formadores del gradiente¹
- Bomba de vacío
- Agitador magnético
- Transiluminador
- Cámara de fotos.



Figura N° 2. Equipo DCode™ Universal Mutation Detection System de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, 1996).

1.3.1.4. Materiales

Los materiales necesarios son los detallados a continuación:

- Vidrios 20*18,5 (2)
- Vidrios 20*16 (2)
- Separadores 1 mm (4)
- Peine 1 mm
- Grapas (clamps) (4)
- Juntas de goma
- Tarjeta espaciadora
- Mangueras.

1. El equipo de Bio-Rad contiene un sistema de jeringas y rueda, el cual, en nuestra experiencia, resulta en gradientes inconsistentes entre corridas, debido principalmente a la manipulación manual de la rueda. Actualmente, utilizamos el sistema de vasos comunicantes acoplado a la bomba de vacío que mejoró notablemente este aspecto de la técnica.



Figura N° 3. Materiales para el armado del gel de DGGE (Bio-Rad Laboratories, 1996).

1.3.1.5. Soluciones

Las soluciones necesarias son las siguientes:

- Acrilamida al 40% (acrilamida-bis-acrilamida 37, 5:1), 38,93 g de acrilamida, 1,07 g de bisacrilamida, agua destilada hasta volumen final 100 ml, filtrar y almacenar a 4 °C.
- TAE 50X: Tris 121 g, ácido acético glacial 28,55 ml, EDTA 0,5 M pH 8 50 ml, agua destilada hasta volumen final 500 ml.
- Urea.
- Formamida.
- Persulfato de amonio (APS) 10%: disolver 0,1 g en 1 ml de H₂O, se conserva por un mes a 4 °C.
- N, N, N', N'-tetrametilendiamina (Temed).
- Buffer de siembra: azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, glicerol 30% v/v.
- Solución de tinción Syber 10000X, puede ser Syber green (Invitrogen S7563) o Syber gold (Invitrogen S11494), el último tiene mayor sensibilidad y menor fondo, pero suele ser menos económico.

Utilizar reactivos de grado biología molecular y agua destilada o bidestilada.

Tabla N° 1. Soluciones stock de acrilamida 6% (filtrar y conservar a 4 °C en botella oscura)

Reactivos	Solución A (0%)	Solución B (80%)
TAE 50X	2 ml	2 ml
40% Bis-Acrilamida	15 ml	15 ml
Urea	-	33,8 gr
Formamida	-	32 ml
H ₂ O	82,5 ml	Llevar a volumen final
Volumen final	100 ml	100 ml

Son varios los agentes tóxicos en este protocolo, formamida, temed y en particular las soluciones de poliacrilamida. En todos los pasos mantener el uso de bata y guantes, incluso después de polimerizar el gel, ya que puede contener cantidades de material no polimerizado. Evitar al máximo los derrames en la mesada, controlando la limpieza de las superficies luego de su uso.

1.3.1.6. Armado del gel

Para el armado del gel, se deben seguir los siguientes pasos:

1. Limpiar los vidrios, separadores y peines con abundante agua y detergente para remover completamente la grasa. Posteriormente enjuagar con agua destilada y limpiar con alcohol 96°.
2. Colocar los separadores entre el vidrio grande y el pequeño, colocar los clamps sosteniendo los vidrios, sin ajustar del todo las tuercas, asegurando que los elementos queden perfectamente alineados (ver Figura N° 4A).
3. Colocar una junta de goma en una de las ranuras del soporte de armado.
4. Llevar los vidrios armados al soporte de armado y sujetarlo en su lugar utilizando las dos llaves laterales (ver Figura N° 4B).
5. Colocar la tarjeta de alineación entre los vidrios, verificar que los dos vidrios y la tarjeta de alineación formen una superficie plana a través de la parte inferior del armado, de ser así, ajustar las tuercas de los clamps (ver Figura N° 4C).
6. Colocar el peine entre los vidrios y dibujar una línea indicativa de tope para la solución de gradiente 3 cm por debajo del borde inferior del peine.
7. Controlar que no existan fugas en el ensamblaje agregando agua destilada, sacar el agua y secar exhaustivamente con papel de filtro.
8. Colocar los vasos comunicantes sobre el agitador, colocar el buzo en el lado derecho, conectar la manguera de salida de los vasos con la bomba, lo que va a permitir la circulación del líquido desde los vasos hasta los vidrios que conforman la cámara del gel.
9. Colocar en la salida de la manguera una punta de tip e insertar la misma en la parte superior de los vidrios, asegurar con cinta adhesiva (ver Figura N° 4D). Es conveniente marcar previamente los vasos con la solución de desnaturalización que le corresponde, alta en el derecho y baja en el izquierdo.

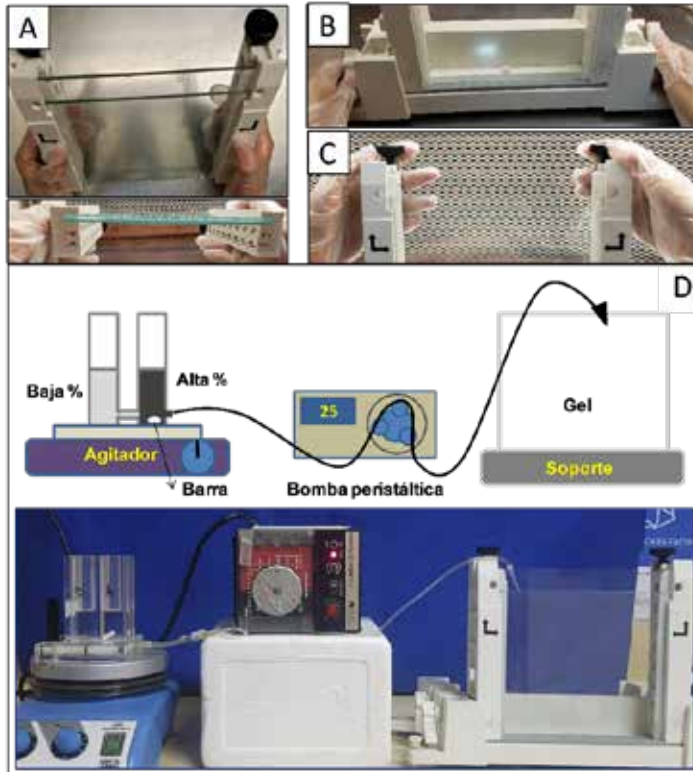


Figura N° 4. Etapas para el armado del gel. A) Armado de los vidrios, colocación de las grapas y alineación de los vidrios con los espaciadores; B) Colocación de los vidrios en el soporte armador; C) Chequeo de la alineación y ajuste de las grapas; D-E) Disposición de los vasos, la bomba, el armador del gel y la manguera que conduce el líquido desde los vasos hasta llegar a los vidrios.

1.3.1.7. Preparación de las soluciones desnaturizantes
Se deben seguir los siguientes pasos:

1. Preparar las dos soluciones para armar el gradiente mezclando las soluciones stock preparadas de 0% y 80% acrilamida (ver Tabla N° 1). Las soluciones de concentración desnaturizante alta y baja son, para el presente protocolo, de 20% y 60%, respectivamente. Para un volumen de 14 ml de cada solución, los volúmenes a mezclar son los que se indican en la Tabla N° 2. Este volumen de gradiente (28 ml) es suficiente para el gel estándar de 16 cm.
2. Agregar el APS 10% (0,1 g en 1 ml de H₂O) y Temed en ambas soluciones, y mezclar inmediatamente. Importante: la polimerización comienza con estos catalizadores, por lo que a partir de este momento es necesario proceder con los siguientes pasos rápidamente.

Tabla N° 2. Soluciones de acrilamida 6% con distintos porcentajes de concentración desnaturalizante. Se destacan las preparadas en el presente protocolo.

Reactivos	Porcentajes Desnaturalización					
	0%	20%	30%	40%	60%	70%
Solución A	6 ml	10,5 ml	8,75 ml	7 ml	3,5 ml	1,75 ml
Solución B	-	3,5 ml	5,25 ml	7 ml	10,5 ml	12,25 ml
Temed	4,15 µl	9,7 µl	9,7 µl	9,7 µl	9,7 µl	9,7 µl
APS	34,6 µl	81 µl	81 µl	81 µl	81 µl	81 µl

1.3.1.8. Formación del gradiente

Seguir los pasos detallados a continuación:

1. Asegurar que la bomba esté apagada y que el canal formador del gradiente entre los vasos esté cerrado (palanca hacia arriba).
2. Colocar las soluciones de alta y baja concentración de desnaturalización en el vaso derecho e izquierdo, respectivamente.
3. Encender el agitador regulando la velocidad, de manera que el buzo colocado en el vaso derecho se mueva de manera circular, lentamente, para lograr un óptimo mezclado de ambas soluciones evitando producir burbujas que afectan la polimerización.
4. Encender simultáneamente la bomba (3,5 ml/min) y mover la palanca de los vasos conductores a la posición horizontal (abierta).
5. Chequear que las soluciones se mezclen, que el flujo sea continuo y que la cámara del gel se llene lentamente.
6. Cortar el flujo cuando el volumen que hay en la cámara del gel llegue hasta el límite previamente marcado.
7. Agregar suavemente con una pipeta unos mililitros de agua hasta lograr una película que cubra el borde superior del gradiente, esto permitirá que se polimerice correctamente.
8. Vaciar inmediatamente los tubos formadores de gradiente, las mangueras y el tip, enjuagar todo con agua.
9. Esperar de 45 a 60 minutos hasta que el gel se solidifique.

10. Eliminar la película de agua con la ayuda de una pipeta o volcando la cámara de manera cuidadosa sobre un papel de filtro.
11. Secar el espacio entre los vidrios utilizando papel de filtro.

1.3.1.9. Gel de apilamiento

Realizar los pasos siguientes:

1. Preparar la solución de apilamiento (*stacking*) como se indica en la Tabla N° 2. Utilizando una pipeta, agregar la solución hasta completar el borde superior del vidrio (alrededor de 5 ml).
2. Colocar el peine, es conveniente que se lo ingrese lentamente, de costado, y luego ubicarlo correctamente, para evitar la formación de burbujas.
3. Esperar que la solución polimerice (alrededor de 15 minutos).

1.3.1.10. Electroforesis

Llevar a cabo los pasos detallados a continuación:

1. Preparar, mientras el gel se solidifica, el buffer de corrida, TAE 1X. Para la corrida en el equipo Bio-Rad, se utilizan aproximadamente 7,5 litros del buffer (150 ml de TAE 50X en H₂O destilada hasta volumen final). Este puede ser reutilizado para correr hasta 4 geles.
2. Colocar el tanque y el buffer dentro de la cuba del equipo. Chequear el nivel del buffer, debe llegar hasta la marca Run y no superar el nivel máximo establecido en el equipo. En caso de ser necesario, reponer o extraer.
3. Colocar el cabezal controlador de temperatura y encender el equipo para precalentar el buffer hasta una temperatura de 50 °C. Nota: para acortar la etapa de precalentamiento, es posible precalentar el buffer de corrida hasta una temperatura cercana a 50 °C antes de verter en el tanque de corrida.
4. Retirar cuidadosamente el peine del gel y enjuagar cada pocillo con buffer de TAE 1X, mientras se calienta el buffer. Para facilitar la siembra de las muestras, se puede marcar la posición de los pocillos sembrando aproximadamente 10 µl de buffer de siembra.
5. Apagar el equipo una vez que el buffer alcanza los 50 °C, sacar el tanque y colocar el ensamble con el gel en el marco sujetador. Independientemente del número de geles que se corran (1 o 2), se deben armar los dos sets con sendos vidrios para cerrar el sistema. Nota: no agregar el montaje con

- los vidrios cuando el buffer está muy caliente (≥ 55 °C), esto podría causar el quiebre de los vidrios.
6. Llevar nuevamente el tanque al equipo y continuar el calentamiento hasta alcanzar los 65 °C.
 7. Preparar las muestras a sembrar. En general, se siembran entre 300 ng y 500 ng de PCR, pero este valor es tentativo, dependiendo del número de bandas que se espera en la muestra o la sensibilidad del método de tinción a utilizar. Mezclar las muestras con el volumen correspondiente del buffer de siembra.
 8. Apagar el equipo una vez alcanzados los 60 °C, sacar el controlador de temperatura y sembrar las muestras en cada pocillo utilizando una micropipeta. Nota: sembrar suavemente, cuidando que la muestra no salga del pocillo ni se formen burbujas.
 9. Colocar nuevamente el controlador de temperatura y conectar al voltaje, inicialmente a 20 V durante 20 minutos. Controlar que la temperatura haya alcanzado nuevamente los 60 °C (baja unos grados de acuerdo al tiempo que se tarde en sembrar las muestras) y luego subir a 100 V por 16 horas. Importante: controlar el nivel del buffer durante la corrida.

1.3.1.11. Finalización de la electroforesis

Para la finalización de la electroforesis, se deben realizar los pasos siguientes:

1. Detener la fuente y apagar el equipo cuando se completó el tiempo de corrida.
2. Sacar el controlador de temperatura y remover el tanque del equipo.
3. Abrir los clamps para liberar los vidrios.
4. Separar lentamente los vidrios, de manera que el gel obtenido quede en el vidrio más largo. Se puede insertar un separador entre los vidrios y aplicar palanca suavemente para evitar romper el gel.
5. Recortar las paredes del gel, descartando la parte superior donde están los pocillos y haciendo una marca en el borde inferior que sirva de referencia para identificar el orden de las muestras².

2. El video realizado por Celeste Peterson (Harvard Medical School) es un tutorial de electroforesis DGGE muy claro y conciso. Si bien se muestra el armado de gradiente con el sistema de rueda y jeringas de Bio-Rad, las etapas de electroforesis son similares al presente protocolo. Disponible en el siguiente link: <https://bit.ly/3gre8DV>

1.3.1.12. Tinción

Para realizar la tinción, seguir los pasos detallados a continuación:

1. Colocar el vidrio con el gel en el contenedor con la solución de tinción, Syber green 1:10000 (5 µl en 50 ml TAE 1X), por 30 a 60 minutos. Utilizar un contenedor plástico que sea ligeramente más grande que el vidrio. Asegurar que la solución de tinción cubra completamente el gel.
2. Transportar el vidrio con el gel a un contenedor plástico con buffer TAE 1X durante 15 a 30 minutos, para eliminar el fondo de tinción (desteñir).
3. Retirar el gel de la solución de tinción deslizándolo cuidadosamente en el transiluminador UV. Si la superficie del iluminador UV está mojada, será más fácil su deslizamiento. Se puede utilizar una piseta con TAE 1X para facilitar la separación y desplazamiento del gel en el transiluminador.
4. Fotografíar el gel tratando de exponer el menor tiempo posible a la luz UV, particularmente si se procederá a la extracción de bandas de interés.

1.3.1.13. Extracción de las bandas y reamplificación

Para extraer las bandas y amplificarlas, realizar los siguientes pasos:

1. Escindir con la ayuda de un bisturí estéril la banda de interés del gel de poliacrilamida.
2. Depositar el trozo de gel en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, conteniendo 100 µl de agua bidestilada estéril, mezclar en agitador vórtex durante 5 minutos.
3. Incubar durante 12 h a 4 °C o alternativamente a 37 °C por 30 minutos.
4. Mezclar en agitador vórtex durante 5 minutos, tomar una alícuota de 1 o 2 µl y usar como molde para la amplificación, con los mismos cebadores usados en la amplificación del DGGE, 341F-GC/907R.
5. Analizar por DGGE el producto de amplificación junto a la muestra original, a fin de determinar si se purificó la banda deseada.
6. Purificar los amplicones usando un kit comercial o alternativamente usamos la purificación por precipitación descrita en Sambrook *et al.* (1989).
7. Precipitar un volumen del producto de PCR con un volumen de NH₄Ac 4 M y dos volúmenes de isopropanol durante toda la noche a -20 °C.
8. Centrifugar a 21 000 g durante 20 minutos, descartar el sobrenadante.

9. Lavar con etanol al 80%.
10. Dejar secar a temperatura ambiente y resuspender en agua bidestilada estéril.
11. Los amplicones purificados pueden ser enviados a secuenciar directamente. La identificación taxonómica de la secuencia resultante se realiza por comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas.

1.3.1.14. Análisis del gel

El análisis de la foto del gel puede realizarse utilizando cualquiera de las herramientas comunes de visualización de imágenes o alternativamente mediante los programas comerciales especializados. Existen varios programas disponibles para la normalización y el análisis de patrones *fingerprinting*, incluyendo los programas GelCompar II (Applied Maths), BioNumerics (Applied Maths), Phoretix (Nonlinear Dynamics), GeneDirectory (Syngene) y Fingerprinting II Informatix (Bio-Rad Laboratories). Con estos programas es posible procesar la imagen, identificar las bandas, cuantificar su intensidad y normalizar los patrones, lo que nos permite poder realizar comparaciones de las bandas en un mismo perfil, de muestras en un gel y de muestras entre diferentes corridas.

Con estas herramientas se puede estimar la riqueza presente en la muestra a partir del recuento de bandas de cada perfil, teniendo en cuenta que este valor de riqueza representa solo los grupos dominantes de la población total.

Por otra parte, si se cuantifica la intensidad relativa de cada banda, se puede calcular la diversidad presente en cada muestra, por ejemplo, el índice de Shannon-Weaver o de Simpson. Asimismo, la identificación de las bandas/especies comunes, así como las diferenciales presentes en todas las muestras, permite generar una matriz binaria (presencia/ausencia) para una comparación cuantitativa entre muestras, lo que se realiza mayormente aplicando algún índice de similitud. En general, los coeficientes de Dice o de Jaccard para matrices de presencia/ausencia o alternativamente coeficientes como el de Steinhaus o el de Pearson en caso de dar peso a la intensidad relativa de las bandas. Los agrupamientos entre los datos de DGGE se han analizado principalmente por métodos jerárquicos como *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA) o mediante análisis de ordenación como el Escalado Multidimensional No Métrico (NMDS), de componentes principales (PCA) o de correspondencia (CA)³.

3. Para revisión acerca del análisis estadístico de datos DGGE, ver Fromin *et al.* (2002), Wilbur *et al.* (2002), Portillo y González (2008).

Por lo común, estos métodos están incluidos en los programas de análisis de *fingerprinting*, donde alternativamente la matriz, generada por el programa o en forma manual, se puede analizar con cualquier programa estadístico disponible.

1.3.2. T-RFLP

El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal T-RFLP surgió en las últimas décadas como una poderosa herramienta para la ecología microbiana. El análisis T-RFLP es uno de los métodos de *fingerprint* de alto rendimiento más utilizados. Debido a su relativa simplicidad, el análisis T-RFLP se ha aplicado al análisis de genes ribosomales de hongos, bacterias y archaeobacterias. Esta técnica se basa en gran medida en una combinación de tecnologías que incluyen la genómica comparativa, PCR y electroforesis de ácidos nucleicos, especialmente electroforesis de alta resolución obtenida mediante analizadores automáticos de secuencias de ADN (Marsh, 1999).

1.3.2.1. Fundamento

El análisis comparativo de la secuencia de ARNr 16S contribuyó en gran medida a nuestra comprensión de la evolución y diversidad microbiana. En el método T-RFLP se utilizan cebadores eubacterianos universales o casi universales para amplificar las regiones conservadas del gen del rDNA 16S del conjunto de ADN genómico extraído de la comunidad estudiada. Al marcar con fluorescencia uno de los cebadores (normalmente el cebador directo), los amplicones resultantes se marcan de forma terminal. Después de la purificación, se someten a una serie de digestiones con enzimas de restricción individuales. Pequeñas diferencias en la secuencia del rDNA 16S entre diferentes especies bacterianas se ponen de manifiesto, como cambios en sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. Dado que los amplicones se marcaron terminalmente, los fragmentos de restricción resultantes también se marcarán terminalmente, de ahí el término fragmentos de restricción terminales (T-RFS). La separación completa de T-RFS de tamaño cercano (± 1 pb) es crucial para obtener resultados precisos y representativos. Para lograr esto, muchos estudios utilizaron sistemas automatizados de secuenciación (Ayala-del-Río *et al.*, 2004; Rademaker *et al.*, 2006).

El patrón de T-RFS es un conjunto de fragmentos de ADN con longitudes únicas que refleja la composición de las poblaciones numéricamente dominantes en la comunidad. Los datos de salida (longitud e intensidad de los picos) se analizan y en ciertas condiciones mediante comparación con las bases de datos de ribosomas

16S, es posible una aproximación a la identificación de especies bacterianas.

1.3.2.2. Diseño/elección de cebadores para la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Idealmente, los cebadores elegidos para el análisis de T-RFLP deberían ser específicos para el grupo taxonómico objetivo, pero lo suficientemente generales para que puedan amplificar todas las poblaciones bacterianas que son de interés. No hay cebadores conocidos que satisfagan estos dos criterios. Las bases de datos de secuencias solo contienen una fracción de la diversidad bacteriana existente, lo que sugiere que los cebadores de uso común están lejos de ser universales. Aunque no existe un cebador perfecto, herramientas como «primer-prevalence tool» en el sitio web de Microbial Community Analysis (MiCA) (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) y la herramienta Probe Match que se encuentra en el sitio web Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) son de gran utilidad a la hora de la elección de cebadores, porque permiten comparar la especificidad y selectividad de diferentes conjuntos de cebadores basados en secuencias en la base de datos.

El uso de cebadores específicos de clase y *phylum* puede proporcionar una mayor sensibilidad y resolución filogenética en comparación con los cebadores específicos de dominio. Hasta la fecha, se han publicado varios cebadores específicos de clase y filo dirigidos al gen del ARN ribosómico 16S (Pfeiffer *et al.*, 2014).

1.3.2.3. Generación de Terminal Restriction Fragments (T-RFS) por digestión con Enzimas de Restricción (ER)

La discriminación de poblaciones bacterianas mediante el análisis de T-RFLP se basa en la detección de polimorfismos en la secuencia del gen del ARNr 16S utilizando Enzimas de Restricción (ER). Normalmente, se utilizan enzimas que tienen sitios de reconocimiento de cuatro pares de bases debido a la mayor frecuencia de estos sitios de reconocimiento. Varios grupos han demostrado que el uso de más de una enzima de restricción facilita la resolución de poblaciones bacterianas (Liu *et al.*, 1997; Marsh, 1999). Esto se debe al hecho de que diferentes poblaciones bacterianas pueden compartir la misma longitud de fragmento de restricción terminal para una combinación particular de cebador y enzima, pero no para otras.

La digestión *in silico* para evaluar la capacidad de las enzimas de restricción para discriminar entre secuencias se puede realizar utilizando herramientas tales como el programa de análisis T-RFLP (TAP) (<http://rdp8.cme.msu.edu/html/TAP-T-RFLP.html>) y MiCA (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>) para genes de ARNr 16S, y

la herramienta implementada por ARB TRF-CUT para genes funcionales (<http://www.mpi-marburg.mpg.de/descargas>).

Es posible que se requieran más de tres ER para asignar con confianza una identidad taxonómica a los T-RF en los perfiles de comunidades ricas, porque muchos taxones compartirán un sitio de corte de restricción común.

1.3.2.4. Análisis de los productos obtenidos

Como primer paso en el análisis de perfiles T-RFLP, la señal debe distinguirse del ruido electrónico, es decir, se debe establecer la línea de base. Programas como Gene Scan y Gene Mapper determinan dónde comienza y termina un pico, su altura y área, pero el investigador debe determinar la línea de base verdadera. La determinación precisa del tamaño de los fragmentos es importante, especialmente si el objetivo es inferir una composición de la comunidad plausible a partir de los perfiles de T-RFLP.

Aunque el análisis de fragmentos de ADN por electroforesis capilar es muy preciso (± 1 pb), no es necesariamente exacto, dado que diferentes factores afectan la relación entre tamaño y movilidad, por ejemplo, el tipo de colorante fluorescente o el contenido de purinas. Por otra parte, el algoritmo Local Southern, comúnmente utilizado, asume que el tiempo de migración de los fragmentos aumenta linealmente con el tamaño del fragmento, pero esto no es cierto, por lo que tiene más error en la región de fragmentos de ADN más grandes.

1.3.2.5. Protocolo

A continuación, se detalla el procedimiento experimental que empleamos rutinariamente en nuestro laboratorio. No obstante, ciertas condiciones de algunas etapas del proceso pueden requerir ajustes menores o el empleo de procedimientos alternativos.

1.3.2.6. Soluciones y equipamiento

Preparar todas las soluciones con agua ultrapura (ya sea bidestilada o sistemas de purificación MilliQ o Barnsted). Todas las puntas de pipeta y los tubos de plástico deben estar libres de nucleasas y ADN.

En este protocolo, todas las enzimas y reactivos –Taq DNA polimerasa, dNTPs y las enzimas de restricción (HaeIII y CfoI, HinfI)– utilizados son de la compañía Promega y se emplearon según las instrucciones provistas por la empresa; sin embargo, las enzimas y reactivos de otras compañías pueden ser igualmente aptas.

1.3.2.7. Cebadores de oligonucleótidos

Los cebadores comerciales se suministran en forma liofilizada. Por ello, es altamente recomendable someter el tubo a un corto pulso de centrifugación (aproximadamente de 15 a 30 segundos a velocidad máxima en una microcentrífuga) antes de agregar el líquido de resuspensión.

- 27f (5'-/56-FAM/GAG-AGT-TTG-ATC-CTG-GCT-CAG-3')
 marcado en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM)
- 1495r (5'-CTA-CGG-CTA-CCT-TGT-TAC-GA-3')

Se recomienda realizar una solución madre de una concentración de 100 μM de los cebadores liofilizados, utilizando buffer Tris 10 mM. A partir de esta solución madre, se puede preparar una solución de trabajo (10 μM) por dilución 1:10 con Tris 10 mM. Ambas soluciones deben ser almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegidas de la luz.

- Agarosa Metaphor 3% (MetaPhorTM Agarose-Lonza): agarosa con alto poder de resolución empleada en electroforesis de fragmentos de PCR.
- Ciclador térmico: dispositivo peltier programable, accesible comercialmente. En nuestro laboratorio utilizamos Eppendorf Mastercycler Gradient.
- ABI 3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*): instrumento de electroforesis capilar para la separación de fragmentos de ADN, según su tamaño y fluorescencia. Este equipo lo poseen los servicios de secuenciación, tales como la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología-Inta Castelar.

1.3.2.8. Procedimiento

El procedimiento (esquemático en la Figura N° 1) consiste en la siguiente secuencia de etapas: generación de fragmentos de ADN marcados con moléculas fluorescentes mediante amplificación por PCR, digestión de los fragmentos obtenidos por PCR con enzimas de restricción, separación y detección de los productos de digestión enzimática y, por último, el análisis de datos.

1.3.2.8.1. Amplificación por PCR

La etapa de marcación por amplificación de los fragmentos específicos de ADN consiste en los siguientes pasos:

1. Preparar en un tubo de 1,5 o 2 ml una mezcla maestra de PCR basada en la receta que se proporciona en la Tabla N° 3, calculada para poder realizar al menos tres reacciones replicadas para cada muestra, reacciones de control positivo y negativo, más un 10% adicional (para resguardo de errores de pipeteo).
2. Colocar alícuotas de 1 µl de las muestras (1 ng/µl) y los controles en tubos de plástico de 0,2 ml, y luego agregar 49 µl de la mezcla maestra de PCR en cada tubo.
3. Colocar los tubos de 0,2 ml en el termociclador y programar con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, *annealing* a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Luego, una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.
4. Verificar todos los productos de PCR mediante electroforesis en gel. Las muestras y los controles positivos deben tener un solo producto del tamaño correcto (es decir, 500 pb), mientras que los controles negativos no deben contener ningún producto de PCR.
5. Combinar los triplicados de cada muestra (3 x 50 µl) en un solo tubo y luego purificar utilizando un kit de limpieza de PCR comercial.
6. Cuantificar los productos de PCR purificados antes de proceder a la digestión.

Tabla N° 3. Receta de la mezcla maestra de PCR para amplificar e incorporar la etiqueta FAM terminal en 1, 10 o 25 reacciones

Reactivo	Stock	Concentración final en la mezcla de PCR	1 PCR	10 PCR	25 PCR
H ₂ O (apta para PCR)			42 µl	420 µl	1050 µl
5x Buffer	15 mM Mg+2	1,5 mM Mg+2	10 µl	100 µl	250 µl
FAM 27f	10 µM	0,2 µM	1 µl	10 µl	25 µl
1495r	10 µM	0,2 µM	1 µl	10 µl	25 µl
dNTP	25mM c/u	250 µM c/u	0,5 µl	5 µl	12,5 µl
GoTaq® G2 DNA	5 U/µl	0,05 U/µl	0,5 µl	5 µl	12,5 µl

1.3.2.8.2. Digestión y separación de los amplicones de PCR con enzimas de restricción

Para realizar la digestión y separación de los amplicones de PCR con enzimas de restricción (ER), se deben seguir los pasos detallados a continuación:

1. Preparar en tres tubos de 1,5 ml en hielo, tres mezclas maestras de ER, una para cada ER, según la receta de la Tabla N°4. Preparar lo suficiente para el número total de muestras y controles, más un 10% extra, y mantener en hielo.
2. Agregar en tubos de 0,2 ml, 20 ng de producto de PCR (por triplicado), llevar a un volumen de 20 µl con agua ultrapura estéril. A cada uno de los tres tubos agregar 5 µl de cada mezcla maestra de ER.
3. Colocar los tubos en un ciclador y programarlos a 37 °C por 4 h, seguido de 80 °C por 20 minutos para inactivar las ER.
4. Chequear los productos de digestión mediante electroforesis en agarosa Metaphor 3% durante 2h a 60V.
5. Separar y analizar los productos de digestión mediante electroforesis capilar (ABI 3130xl Genetic Analyzer-Applied Biosystems). Este proceso es realizado en el servicio de secuenciación.

Tabla N° 4. Recetas de mezclas maestras de ER para las enzimas (a) *HinfI*, (b) *HaeIII* y (c) *CfoI*, si se obtienen de Promega

Reactivo	1 digestión	10 digestiones	25 digestiones
(a)			
H ₂ O	2,0 µl	20 µl	50 µl
10x Buffer	2,5 µl	25 µl	62,5 µl
HinfI [10 U/µl]	0,5 µl	5 µl	12,5 µl
(b)			
H ₂ O	2,0 µl	20 µl	50 µl
10x Buffer	2,5 µl	25 µl	62,5 µl
HaeIII [10 U/µl]	0,5 µl	5 µl	12,5 µl
(c)			
H ₂ O	2,0 µl	20 µl	50 µl
10x Buffer	2,5 µl	25 µl	62,5 µl
CfoI [10 U/µl]	0,5 µl	5 µl	12,5 µl

1.3.2.8.3. Análisis de datos

Para el análisis de los datos, se pueden seguir los siguientes pasos:

- Exportar los datos del perfil T-RFLP sin procesar desde el Genetic Analyzer ABI 3130xl y analizar con diferentes programas, una herramienta muy utilizada y de fácil acceso es la desarrollada por Culman *et al.* (2009), accesible en el sitio web <http://trex.biohpc.org/>
- Definir los picos que son significativos para el posterior análisis. Cada operador debe determinar qué es apropiado para su conjunto de datos, pero un buen comienzo es establecer el ancho de banda en 1,5 nt y recortar los perfiles entre 50 nt y 550 nt. Establecer la línea base de intensidad de fluorescencia (ruido).
- Exportar los archivos conteniendo el área del pico y el tamaño del pico (longitud en nt), como planilla Excel, por ejemplo, el que luego puede ser importado en varios programas para un análisis más detallado.
- Comparar y usar los perfiles replicados de la misma muestra para generar un perfil consenso usando T-Align (<http://inismor.ucd.ie/~talign/>). El perfil consenso solo contiene los T-RFS que están presentes en ambas réplicas.
- Comparar en una segunda etapa todos los perfiles de consenso y generar un archivo conteniendo todos los T-RFS y su intensidad de fluorescencia relativa. Los fragmentos que difieren en 1 pb o menos se consideran iguales. Este último archivo se utiliza para el posterior análisis.

A partir de aquí, el análisis que se lleva a cabo depende del interés del estudio. Por ejemplo, si se quieren visualizar relaciones, el análisis de componentes principales (PCA) es la elección de rutina. Para asociar cambios en la comunidad con diferencias ambientales, un análisis de correspondencia canónica (CCA) o análisis de redundancia (RDA) son apropiados.

En resumen. La marcada diversidad taxonómica y metabólica de los microorganismos convierte a este grupo en un importante indicador biológico para reflejar la mayoría de los procesos ecológicos en los diferentes sistemas. El estudio de las bacterias del suelo a través de métodos de cultivo-dependientes presenta limitaciones debido a que cerca del 99% de una comunidad microbiana presente en el ambiente no es accesible por métodos tradicionales de aislamiento. Los análisis tradicionales de la microbiota, mediante su crecimiento en el laboratorio, estuvieron restringidos al observar el comportamiento de una población minoritaria

(1%) que difícilmente fuese representativa de la población total. El desarrollo de procedimientos basados en el análisis de componentes celulares tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) extraídos directamente del ambiente ha permitido acceder a los sistemas microbianos en su diversidad y totalidad, pudiendo describir su estructura, la función y la interrelación funcional entre sus miembros en sus ambientes. Estas técnicas, debido a su sensibilidad y rapidez, se aplican cada vez más en la actualidad. En este capítulo hemos descrito un protocolo que pretende ser asequible en términos económicos (de costos y tiempo), a fin de ser aplicado para el estudio de comunidades microbianas de suelo por métodos no cultivables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.J., Minh, B.Q., Urich, T. *et al.* (2018). «Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes». *Nature Communications*, 9, 1517.
- AYALA DEL RÍO, H.L., Callister, S.J., Criddle, C.S. y Tiedje, J.M. (2004). «Correspondence between community structure and function during succession in phenol- and phenol-plus-trichloroethene-fed sequencing batch reactors». *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4950-4960.
- BERG, G., Rybakova, D. y Fischer, D. *et al.* (2020). «Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges». *Microbiome*, 8, 103.
- Bio-Rad Laboratories (1996). *The DCode™ Universal Mutation Detection System*. Disponible en <https://bit.ly/3JyhSwz>
- BISSETT, A., Cook, P.L.M., Macleod, C., Bowman, J.P. y Burke, C. (2009). «Effects of organic perturbation on marine sediment beta-proteobacterial ammonia oxidizers and on benthic nitrogen biogeochemistry». *Marine Ecology Progress Series*, 392, 17-32.
- BRAKER, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H. y Tiedje, J.M. (2000). «Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities». *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2096-104.

- CHELIUS, M.K. y Triplett, E.W. (2001). «The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L». *Microbial Ecology*, 41, 252-263. Doi: 10.1007/s002480000087. PMID: 11391463
- COLLAVINO, M.M., Tripp, H.J., Frank, I.E., Vidoz, M.L., Calderoli, P.A., Donato, M., Zehr, J.P. y Aguilar, O.M. (2014). «nifH pyrosequencing reveals the potential for location-specific soil chemistry to influence N₂ -fixing community dynamics». *Environmental Microbiology*, 16, 3211-23. Doi: 10.1111/1462-2920.12423
- CULMAN, S.W., Bukowski, R. y Gauch, H.G. *et al.* (2009). «T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data». *BMC Bioinformatics*, 10, 171.
- DEVI, S.G., Fathima, A.A., Radha, S., Arunraj, R., Curtis, W.R. y Ramya, M. (2015). «A Rapid and Economical Method for Efficient DNA Extraction from Diverse Soils Suitable for Metagenomic Applications». *PLoS One*, 10, e0132441.
- DINEEN, S.M., Aranda, R., Anders, D.L. y Robertson, J.M. (2010). «An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil». *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1886-1896.
- FROMIN, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D. y Jourdain-Miserez, K. *et al.* (2002). «Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns». *Environmental Microbiology*, 4, 634-643.
- GIEBLER, J., Wick, L.Y., Chatzinotas, A. y Harms, H. (2013). «Alkane-degrading bacteria at the soil-litter interface: comparing isolates with T-RFLP-based community profiles». *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 45-58.
- GREEN, S.J., Leigh, M.B. y Neufeld, J.D. (2009). «Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis». En Timmis, K.N. (ed.) *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds* (pp. 4137-4158). Heidelberg, Alemania: Springer. Doi: 10.1007/978-3-540-77587-4
- GUPTA, V.V.S.R., Zhang, B., Penton, C.R., Yu, J. y Tiedje, J.M. (2019). «Diazotroph diversity and nitrogen fixation in summer active perennial grasses in a mediterranean region agricultural soil». *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 115.
- HEUER, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. y Wellington, E.M.H. (1997). «Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients». *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.
- HOSHINO, T., Doi, H., Uramoto, G.I., Wörmer, L. y Adhikari, R.R. *et al.* (2020). «Global diversity of microbial communities in marine sediment». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 27587-27597.

- INCEOGLU, O., Hoogwout, E.F., Hill, P. y Van Elsas, J.D. (2010). «Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil». *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3378-3382.
- KOWALCHUK, G.A., Stephen, J.R., Deboer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. y Woldendorp, J.W. (1997). «Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments». *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1489-1497.
- LAKAY, F., Botha, A. y Prior, B. (2007). «Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils». *Journal of Applied Microbiology*, 102, 265-273.
- LILES, M.R., Manske, B.F., Bintrim, S.B., Handelsman, J. y Goodman, R.M. (2003). «A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library». *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2684-2691.
- LIU, J., Wang, J., Gao, G., Bartlam, G.M. y Wang, Y. (2015). «Distribution and diversity of fungi in freshwater sediments on a river catchment scale». *Frontiers in Microbiology*, 6, 329.
- LIU, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997). «Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA». *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522.
- MARSH, T.L. (1999). «Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products». *Current Opinion in Microbiology*, 2, 323-327.
- MARTIN-LAURENT, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R. y Germon, J.C. *et al.* (2001). «DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods». *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2354-2359.
- MUYZER, G. (1999). «DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems». *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.
- MUYZER, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. y Wawer, C. (1998). «Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology». En Akkermans, A.D.L., Elsas, J.D.V. y Bruijn, F.J.D. (eds.) *Molecular microbial ecology manual* (pp. 1-27). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- MUYZER, G., De Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G. (1993). «Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA». *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

- MYERS, R.M., Fisher, S.G., Lerman, L.S. y Maniatis, T. (1985). «Neally all single substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis». *Nucleic Acids Res*, 13, 3131-3145.
- NAKATSU, C.H. (2007). «Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis». *Soil Science Society of America Journal*, 71, 562-571.
- ORLEWSKA, K., Piotrowska-Seget, Z. y Cycoń, M. (2018). «Use of the PCR-DGGE Method for the Analysis of the Bacterial Community Structure in Soil Treated with the Cephalosporin Antibiotic Cefuroxime and/or Inoculated with a Multidrug-Resistant *Pseudomonas putida* Strain MC1». *Frontiers in Microbiology*, 9, 1387.
- ORR, C.H., James, A., Leifert, C., Cooper, J.M. y Cummings, S.P. (2011). «Diversity and Activity of Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria and Total Bacteria in Organic and Conventionally Managed Soils». *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 911-919.
- OSBORN, A.M., Moore, E.R.B. y Timmis, K.N. (2000). «An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics». *Environ Microbiology*, 2, 39-50.
- PAUL, T., Basu, S. y Sarkar, K. (2014). «SPION-mediated soil DNA extraction and comparative analysis with conventional and commercial kit-based protocol». *Biotech*, 4, 669-677.
- PEREIRA E SILVA, M.C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., Van Elsas, J.D. y Salles, J.F. (2013). «Temporal Dynamics of Abundance and Composition of Nitrogen-Fixing Communities across Agricultural Soils». *PLoS ONE*, 8, e74500.
- PESTER, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngroft, A., Richter, A. y Overmann, J. *et al.* (2012). «amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions». *Environ Microbiology*, 14, 525-39.
- PFEIFFER, S., Pastar, M., Mitter, B., Lippert, K., Hackl, E., Lojan, P., Oswald, A. y Sessitsch, A. (2014). «Improved group-specific primers based on the full SILVA 16S rRNA gene reference database». *Environ Microbiology*, 16, 2389-407.
- PHILIPPOT, L., Abbate, C., Bispo, A., Chesnot, T., Hallin, S. y Lemanceau, P. *et al.* (2010). «Soil microbial diversity: an ISO standard for soil DNA extraction». *Journal of Soils and Sediments*, 10(7), 1344-1345.
- PLASSART, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S. y Lelièvre, M. *et al.* (2012). «Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure». *PLoS One*, 7, e44279.
- POLZ, M.F. y Cavanaugh, C.M. (1998). «Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR». *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3724-30.

- PORTILLO, M.C. y González, J.M. (2008). «Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities». *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 157-163.
- RADEMAKER, J.L.W., Hoolwerf, J.D., Wagendorp, A.A. y Te Giffel, M.C. (2006). «Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting». *International Dairy Journal*, 16, 457-466.
- RITCHIE, N.J., Schutter, M.E., Dick, R.P. y Myrold, D.D. (2000). «Use of Length Heterogeneity PCR and Fatty Acid Methyl Ester Profiles to Characterize Microbial Communities in Soil». *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1668-1675.
- ROTHBERG, J.M. y Leamon, J.H. (2008). «The development and impact of 454 sequencing». *Nature Biotechnology*, 26, 1117-1124.
- SAMARAJEEWA, A.D., Hammad, A., Masson, L., Khan, I., Scroggins, R. y Beaudette, L. (2015). «Comparative assessment of next-generation sequencing, denaturing gradient gel electrophoresis, clonal restriction fragment length polymorphism and cloning-sequencing as methods for characterizing commercial microbial consortia». *Journal of Microbiology Methods*, 108, 103-111.
- SAMBROOK, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a ed.) Plainview, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHLOSS, P.D. y Handelsman, J. (2003). «Biotechnological prospects from metagenomics». *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-10.
- SCHWIEGER, F. y Tebbe, C.C. (1998). «A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis». *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4870-4876.
- THIES, J.E. (2015). «Molecular Approaches to Studying the Soil Biota». En Eldor, A. Paul (ed.) *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (4a ed.) Chapter 6 (pp. 151-185). EE.UU.: Academic Press.
- TORSVIK, V. y Ovreas, L. (2002). «Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems». *Current Opinion Microbiology*, 5, 240-5.
- VAN DORST, J., Bissett, A., Palmer, A.S., Brown, M., Snape, I. y Stark, J.S. *et al.* (2014). «Community fingerprinting in a sequencing world». *FEMS Microbiology Ecology*, 89, 316-330.
- WATANABE, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K. y Kimura, M. (2004). «DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil». *FEMS Microbiology Letters*, 232, 153-163.
- WEBER, S.D., Hofmann, A., Pilhofer, M., Wanner, G., Agerer, R. y Ludwig, W. *et al.* (2009). «The diversity of fungi in aerobic sewage granules assessed by 18S rRNA gene and ITS sequence analyses». *FEMS Microbiology Ecology*, 68, 246-254.

- WILBUR, J., Ghosh, J.K., Nakatsu, C.H., Brouder, S.M. y Doerge, R.W. (2002). «Variable selection in high-dimensional multivariate binary data with application to the analysis of microbial community DNA fingerprints». *Biometrics*, 58, 378-386.
- WIKSTRÖM, P., Andersson, A.C. y Forsman, M. (1999). «Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principal component analysis». *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 131-139. Disponible en <https://bit.ly/3uoZIXC>
- WILBUR, J., Ghosh, J.K., Nakatsu, C.H., Brouder, S.M. y Doerge, R.W. (2002). «Variable selection in high-dimensional multivariate binary data with application to the analysis of microbial community DNA fingerprints». *Biometrics*, 58, 378-386.
- YEATES, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N. y Veal, D.A. (1998). «Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification». *Biological procedures online*, 1, 40-47.
- ZEHR, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. y Steward, G.F. (2003). «Minireview Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison». *Environ Microbiology*, 5, 539-554.
- ZHOU, J., Bruns, M.A. y Tiedje, J.M. (1996). «DNA recovery from soils of diverse composition». *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 316.

Autoras y autores

Silvia A. Arzuaga es ingeniera agrónoma, jefa de trabajos prácticos con dedicación exclusiva en la cátedra de Edafología (FCA-UNNE) y alumna del Doctorado en Recurso Naturales de la UNNE.

Karina R. Ávalos Llano es profesora adjunta DS de Microbiología Industrial de la FCA-UNNE, jefa de trabajos prácticos en Bromatología (FaCENA-UNNE), bioquímica (FaCENA-UNNE), doctora en Química (FaCENA-UNNE) y docente investigadora categoría 3.

Natalia Banegas es ingeniera zootecnista, doctora en Ciencias Biológicas (IIACS-Ciap-Inta, Leales, Tucumán), coordinadora del Área Forrajes y Pasturas, cátedra de Edafología (FAZ-UNT), San Miguel de Tucumán, Tucumán, y profesora y jefa de trabajos prácticos.

Sebastián Carnicer es ingeniero agrónomo, magíster en Producción Vegetal (FCA-UNNE), coordinador de laboratorios de Suelo, Agua, Vegetal y Enmiendas Orgánicas (Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, UNNE) y auxiliar docente de primera.

María E. Castelán es ingeniera agrónoma egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, magíster en Gestión Ambiental de la Facultad de Arquitectura y Urbanismo (UNNE), profesora adjunta del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo y docente de la cátedra de Forrajicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Mónica M. Collavino es doctora en Ciencias Biológicas (Facultad de Ciencias Exactas-UNLP), profesora adjunta con dedicación

exclusiva en la cátedra Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) e investigadora adjunta de Conicet.

Stella M. Contreras Leiva es ingeniera agrónoma, personal de apoyo a la investigación en la cátedra de Edafología (FCA-UNNE) y desarrolla sus actividades en el laboratorio del Servicio a terceros de suelos y foliares de la cátedra de Edafología.

Amilcar Correa es alumno de Ingeniería Agronómica, en la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) y adscripto en investigación.

Marcela R. Cossoli es ingeniera agrónoma y jefa de trabajos prácticos en la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

Mario R. Delfino es licenciado en Ciencias Químicas, doctor en Química (FaCENA-UNNE), profesor titular de Química Analítica III y profesor responsable de Química Analítica Instrumental, Química Analítica II, Electroanalítica y Química Analítica Aplicada.

Mariana Ferreira es alumna de Ingeniería Agronómica, en la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) y es adscripta en investigación.

Daniela González es alumna de Ingeniería Agronómica, en la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) y becaria con prestación efectiva de servicios.

Daniel H. Grasso es doctor en Ciencias Bioquímicas (UNLP), investigador Inta P8-27, Instituto de Suelos, profesor ordinario de la Universidad Nacional de Quilmes en Genética Molecular y coordinador del Proyecto Específico de Bioenergía Inta y del proyecto Babetreal-5 (Horizon, 2020, UE).

Claudina M. Hack es ingeniera agrónoma egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, magíster en Producción Animal Subtropical de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, jefa de Trabajos Prácticos del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo y de la cátedra de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias.

María C. Iglesias es ingeniera agrónoma (FCA-UNNE, 1981), magíster en Gestión Ambiental y Ecología (FAU-FaCENA-UNNE, 2001), profesora titular por concurso con dedicación exclusiva de

la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE), Categoría 2 y directora del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo (FCA-UNNE) y de la revista Agrotecnia (2014- 2022).

Natalia Mansilla es ingeniera agrónoma, trabaja en el Departamento de estudio de suelos y conservación, Dirección de Suelos y Agua Rural, Subsecretaría de Agricultura del Ministerio de Producción, Industria y Empleo del Chaco, es jefa de departamento A/C y adscripta al Laboratorio de Biología de Suelos del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo (FCA-UNNE).

Cecilia Martín es alumna de Ingeniería Agronómica y adscripta en investigación en la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

Germán L. Pérez es ingeniero agrónomo, especialista en Fertilidad de suelos y fertilización, técnico profesional del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo (FCA-UNNE) y docente auxiliar de primera categoría en Introducción a las Ciencias Agrarias (FCA-UNNE).

Miriam Porta es ingeniera agrónoma egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, magíster en Producción Animal Subtropical de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, jefa de Trabajos Prácticos del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo y de la cátedra de Forrajicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Julieta Rojas es ingeniera agrónoma, magíster en Producción Sostenible (Universidad Nacional de Tucumán), máster internacional en Agroecología (Universidad Internacional de Andalucía), investigadora del Área Agronomía y Recursos Naturales de la EEA-Inta Sáenz Peña y coordinadora del SP Brown del Observatorio de Degradación de Tierras y Desertificación.

José M. Recalde es ingeniero agrónomo, trabaja en la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) y es adscripto en investigación.

Amalia M. E. Romero es ingeniera agrónoma y jefa de trabajos prácticos en la cátedra Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

Matías H. Serafini es alumno de Ingeniería Agronómica, en la cátedra de Microbiología Agrícola (FCA-UNNE) y adscripto en investigación.

Andrea A. Sirio es bioquímica, técnica profesional en el Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo de la FCA-UNNE y jefa de trabajos prácticos en Microbiología Industrial de la FCA-UNNE.

Cristina E. Sotelo es ingeniera agrónoma, máster en Producción Vegetal, docente investigadora del Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la UNNE y alumna del Doctorado de Recursos Naturales de la FCA-UNNE.

Marcela Toledo es ingeniera agrónoma, doctora en el Área en Recursos Naturales (2014, UNNE), con un posdoctorado en la Universidad de Sevilla (2017) y profesora adjunta A/C de la cátedra de Edafología (FCA-UNNE) de manera exclusiva.

Emilce Viruel es licenciada en Biotecnología, doctora en Ciencias Biológicas (IIACS-Ciap-Inta, Leales, Tucumán) y jefa del grupo Ciclos Biogeoquímicos (IIACS).

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo. Se compuso y diagramó en Eudene, en el mes de marzo de 2023.



Rector

Gerardo Omar Larroza

Vicerrector

José Leandro Basterra

**Coordinación de
Comunicación Institucional**

María Gabriela Bissaro

Gerente

Carlos Quiñonez



«El manejo adecuado de los suelos es la llave mágica para la prosperidad y el bienestar general. La naturaleza en sus caprichos y misterios se concentra en cosas pequeñas, el poder dirigir a las grandes; en las sutiles, la potencia de dominar a las más groseras; en las cosas simples, la capacidad de regir a las complejas [...] La biología del suelo, su diversidad y la complejidad de sus interacciones se constituyen en un aspecto central, que media gran parte de los procesos edáficos».

Ana Primavesi

Numerosos son los estudios actuales, relativos a la selección de parámetros biológicos –recuentos, biomasa microbiana, enzimas, respiración y N mineralizable– como a métodos genéticos, que responden, en forma rápida y segura, a los cambios físicos y químicos del suelo. *Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo* es un manual de técnicas que ayuda a determinar el impacto de diversos manejos de los suelos, así como sus efectos sobre las condiciones ambientales. El Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo logró reunir, en un trabajo interinstitucional de laboratorios del NEA, a distintos profesionales que trabajan apasionadamente para analizar, evaluar y recomendar prácticas para cuidar la salud del suelo.

