



Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,  
Ganadería y Pesca

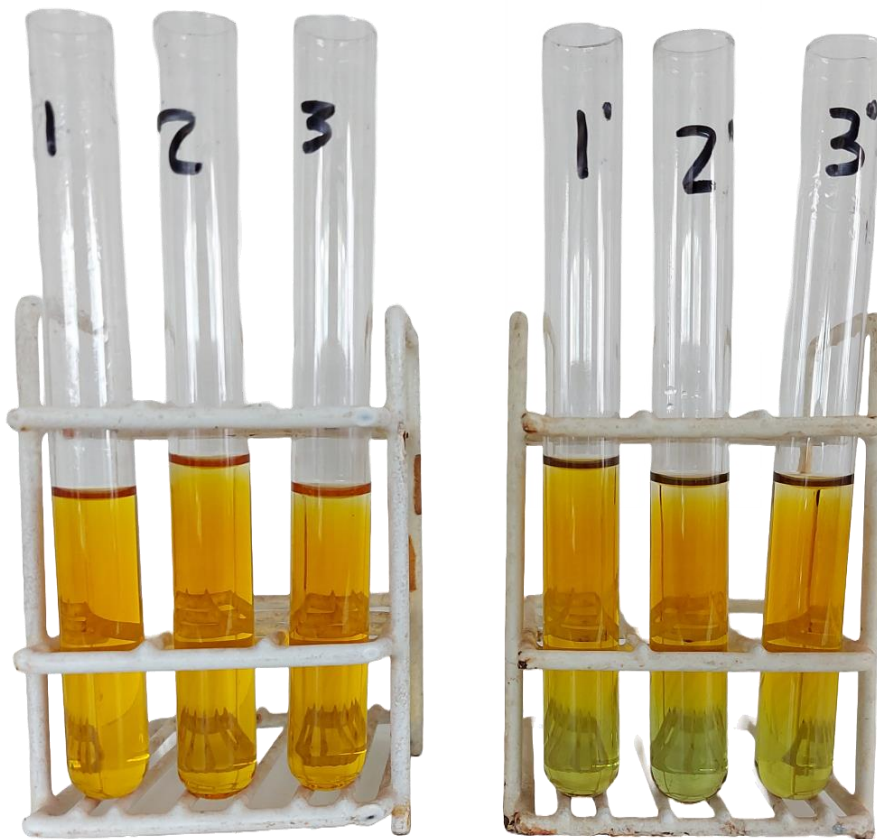


Ministerio de Economía  
Argentina

---

**INFORME FINAL**  
**PRIMER ENSAYO COLABORATIVO**  
**TÉCNICA BIOMASA MICROBIANA DEL SUELO**  
**AGOSTO 2022**

---



**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA**  
**CENTRO REGIONAL CORDOBA**  
**EEA MARCOS JUAREZ**  
**LABORATORIO DE BIOLOGIA DE SUELOS**

## INDICE

1. LISTA DE PARTICIPANTES	3
2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LABORATORIOS	4
3. INTRODUCCIÓN	5
a. Justificación	
b. Objetivos	
4. MUESTRA ENVIADA	6
a. Preparación y características de la muestra	
5. MÉTODOS UTILIZADOS POR LOS PARTICIPANTES	6
6. RESULTADOS ENVIADOS POR LOS PARTICIPANTES	6
a. Datos enviados	
b. Métodos de ensayo	
7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	6
8. EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DE LOS LABORATORIOS	7
9. COMENTARIOS FINALES	8
10. BIBLIOGRAFÍA	8
ANEXO I: Resultados	
ANEXO II: Metodologías	

### Coordinadores del Ensayo:

Dra. Valeria Faggioli, Laboratorio de Biología de Suelos. INTA - EEA Marcos Juárez

Bioq. Claudio Lorenzon. Laboratorio de Química de Suelos. INTA - EEA Marcos Juárez

### Cómo citar este informe:

Faggioli, VS; Lorenzon, C. 2022. I ENSAYO COLABORATIVO PARA ANÁLISIS DE CARBONO DE BIOMASA MICROBIANA. Informe Final. Agosto 2022. Informe técnico de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

## 1. LISTA DE PARTICIPANTES (por orden alfabético de provincia)

### Provincia de Buenos Aires

#### EEA-INTA Pergamino

Ruta 32 km 4.5 CP2700 e-mail: dalpiaz.maria@inta.gob.ar

#### Instituto Suelos - INTA Castelar

De los Reseros y Nicolás Repetto s/n, Hurlingham, CPB1686 e-mail: frasier.ileana@inta.gob.ar

### Provincia de Córdoba

#### Análisis Agropecuarios

25 de mayo 7 Villa Nueva CP5903 e-mail: analisisagropecuariosvm@gmail.com

#### EEA INTA Marcos Juárez

Ruta 12 km 36 Marcos Juárez CP2580 e-mail: maury.mariana@inta.gob.ar

#### IPAVE-CIAP-INTA, Córdoba

Av. 11 de Septiembre 4755 CP5020 e-mail: serri.danne@inta.gob.ar

### Provincia de Salta

#### EEA-INTA-Salta

Ruta Nacional 68 Km 172 Cerrillos CP4003 e-mail: perez.carolina@inta.gob.ar

### Provincia de Santa Cruz

#### EEA-INTA Santa Cruz

Mahatma Gandhi 1322 Río Gallegos CP 9400 e-mail: gargaglione.veronica@inta.gob.ar

### Provincia de Santa Fe

#### EEA-INTA Rafaela

Ruta 34 km 227 Rafaela e-mail: neder.veronica@inta.gob.ar

#### FCA UNR

Campo Experimental J. Villarino – Zavalla CP2123 e-mail: martikabortolato@hotmail.com

### Provincia de Santiago del Estero

#### FAyA-UNSE

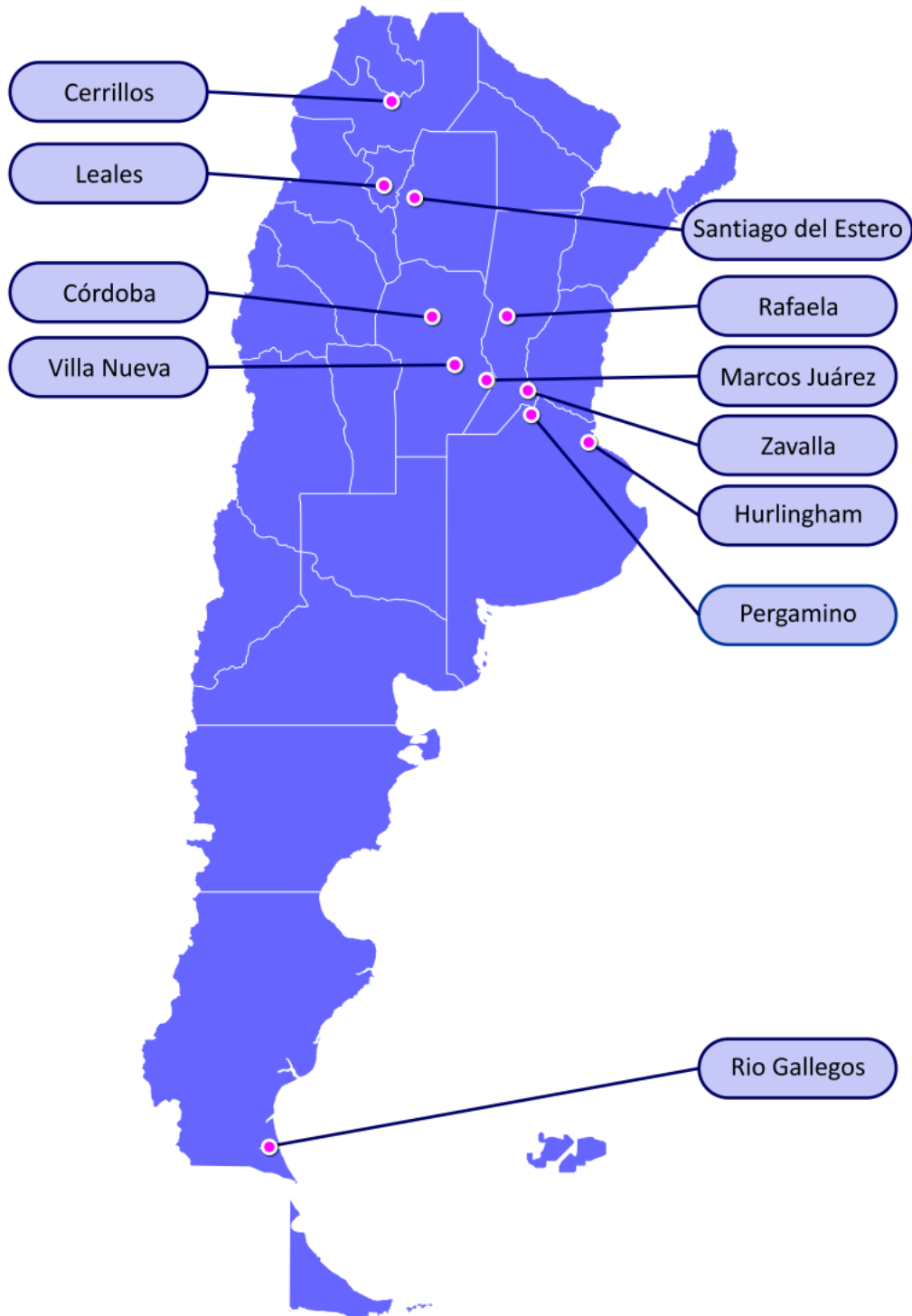
Ejército del Norte 121, CP 4200 e-mail: analiaanriquez@gmail.com

### Provincia de Tucumán

#### IIACS-INTA Leales, Tucumán

Chañar Pozo s/n, Leales, CP4113 e-mail: viruel.emilce@inta.gob.ar

## 2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS LABORATORIOS



### 3. INTRODUCCIÓN

La biomasa microbiana del suelo, una reserva de materia orgánica pequeña y altamente dinámica, juega un papel fundamental en la fertilidad edáfica. Por lo tanto, es importante contar con un método preciso y rápido para medir el carbono de la biomasa microbiana. La cantidad de biomasa microbiana en una muestra de suelo dada es inherentemente difícil de medir. Hasta cierto punto, cualquier medición de la biomasa microbiana es relativa: diferentes metodologías o variaciones en las metodologías producirán estimaciones de biomasa microbiana que no son directamente comparables.

La mayoría de los investigadores utilizan el método de fumigación con cloroformo y posterior extracción y cuantificación del carbono. Sin embargo, hay variaciones en las metodologías de exposición del cloroformo que puede ser directa en el tubo o mediante la aplicación de vacío, las cuales, además, varían en el tiempo de exposición al agente biocida. Existen reportes que indican la factibilidad de reemplazar el cloroformo por la aplicación de determinada cantidad de potencia por masa de suelo suministrada a través de microondas y, en consecuencia, evitar la exposición de los operarios a un agente de reconocida peligrosidad como es el cloroformo.

#### a. Justificación

Los análisis de suelos son una herramienta esencial tanto en la toma de decisiones de los profesionales y productores agropecuarios como para el sector académico que demanda rigor científico para la generación de información básica.

Como cualquier determinación analítica, la cuantificación de carbono de la biomasa microbiana está sometida a múltiples fuentes de error que afectan en su conjunto la exactitud de los resultados. Para enmendar estos errores, los laboratorios de ensayos deben establecer un sistema de calidad interno que asegure que los factores técnicos, administrativos, humanos y económicos estén controlados con el propósito de prevenir y evitar sesgos e imprecisión.

#### b. Objetivos

**Objetivo 1:** Validar los métodos de ensayos de carbono de biomasa microbiana del suelo

**Objetivo 2:** Validar la utilización de microondas como sustituto del cloroformo en el ensayo de carbono de biomasa microbiana del suelo.

#### **4. MUESTRA ENVIADA**

En la presente ronda interlaboratorio, se distribuyó una muestra de suelo a cada laboratorio participante en cantidad suficiente para realizar los análisis solicitados.

##### **a. Preparación y características de la muestra**

El material utilizado para la preparación del ítem de ensayo corresponde al horizonte superficial de un suelo agrícola ubicado en la EEA Marcos Juárez (Argiudol típico). La muestra se extrajo con pala hasta los 10 cm de profundidad. El suelo se tamizó por 2 mm de malla y se secó a temperatura ambiente para ser fraccionado en recipientes de plástico de 1000 cc de capacidad. Se realizó la homogeneización del material recolectado de manera tal de enviar una muestra homogénea a todos los laboratorios participantes.

Ese mismo material fue analizado en el laboratorio de suelos de EEA Marcos Juárez y se registró 4,15% de materia orgánica; 5,5 unidades de pH; 0,12 mS/cm de conductividad eléctrica 1:2,5; y 71 ppm de fósforo por método Bray y Kurtz 1.

#### **5. MÉTODOS UTILIZADOS POR LOS PARTICIPANTES**

Las características más importantes de las metodologías empleadas se detallan en la Tabla 2 de Anexo I. Aunque cada uno de los laboratorios ha adaptado diferentes etapas del método, en Anexo II se adjunta la metodología de base empleada por la mayoría de los laboratorios consistente en la fumigación directa en tubo. También, se adjunta una metodología propuesta para fumigación por vacío y extracción, y el procedimiento para calibración de microondas.

#### **6. RESULTADOS ENVIADOS**

Los datos enviados por los participantes pueden verse en la Tabla 1 del Anexo I. En las Figuras 1 y 2 del Anexo I se presenta, además, el valor medio de los valores informados por todos los laboratorios y la desviación estándar obtenidos aplicando el procedimiento estadístico descrito en el punto 6.

#### **7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Se obtuvo el valor de referencia (VMIL) y la desviación estándar entre laboratorios ( $s^*$ ) a través del consenso entre los participantes.

Los resultados del análisis estadístico pueden observarse en la Tabla 1, donde se informa para cada método el valor de referencia entre laboratorios (VMIL) que es la media de los valores informados por los laboratorios, la desviación estándar entre laboratorios ( $s^*$ ) y la desviación estándar relativa porcentual (CV)

**Tabla 1: Reporte de estadísticos para estimación de Carbono de Biomasa del suelo mediante método con cloroformo y método con microondas.**

Ensayo	VMIL ( $\mu\text{gC g}^{-1}$ suelo)	S*	CV
Método con cloroformo	241	98	41%
Método con microondas	190	71	38%

De acuerdo a la combinación de métodos empleados por los laboratorios y los resultados informados, se generaron tres grupos de métodos (Tabla 2). Los resultados permiten inferir que la opción de digestión inmediata luego de la extracción del extracto permite obtener menor coeficiente variación de resultados (Tabla 2)

**Tabla 2: Medidas estadísticas de resumen según método de fumigación con cloroformo (directo/vacío) y momento de realizar digestión (inmediata luego del filtrado/posterior de un tiempo en freezer o heladera). Información obtenida de Tabla 2 de Anexo I.**

Método	n	Media $\mu\text{gC g}^{-1}$ suelo	D.E.	CV	Mín	Máx
Fumigación directa_Digestión inmediata	12	332	95	29%	181	495
Fumigación directa_Digestión posterior	12	196	57	29%	131	323
Fumigación por vacío_Digestión inmediata	8	174	29	17%	131	216

D.E: Desvío Estándar, CV: Coeficiente de variación (desviación estándar relativa porcentual)

## 8. EVALUACION DEL DESEMPEÑO DE LOS LABORATORIOS

La evaluación del desempeño de los laboratorios participantes se realizó de acuerdo con los procedimientos aceptados internacionalmente (ISO/IEC 13528, 2005) pero no se asignaron valores de incertidumbre para la estimación de los estadísticos.

Se utilizó como criterio el cálculo del parámetro “z”, definido de la siguiente manera:

$$z = (x - \text{VMIL}) / s^*$$

Donde:

x : valor promedio informado por cada laboratorio. Los valores del parámetro z así obtenidos pueden observarse en Tablas 3 y 4 y en Figuras 3 y 4 del Anexo I.

Es posible clasificar a los laboratorios de la siguiente forma:

| z | ≤ 2 satisfactorio, 2 < | z | < 3 cuestionable, | z | ≥ 3 no satisfactorio.

De acuerdo a los resultados informados, todos los laboratorios participantes tuvieron un desempeño “satisfactorio” en ambas metodologías (Tablas 3 y 4 y en Figuras 3 y 4 del Anexo I)

## 9. COMENTARIOS FINALES

De acuerdo a lo planteado en el objetivo 1, se evaluó el desempeño de los laboratorios para la metodología de cuantificación de carbono de biomasa microbiana. A pesar de la variación en las metodologías empleadas por los participantes, el 80% de los valores informados mediante ensayo de fumigación con cloroformo se mantuvo dentro del rango de variación de una unidad de desvío estándar y todos tuvieron un desempeño “satisfactorio” según el parámetro z.

Con respecto al objetivo 2, un número reducido de laboratorios se sumó a la iniciativa de validación de la técnica propuesta. La adopción de la metodología de microondas demostró menor variación y menor dispersión en los resultados. El 75% de los valores informados se mantuvieron dentro del rango de la unidad de desviación estándar entre laboratorios y todos tuvieron un desempeño “satisfactorio” según el parámetro z.

De acuerdo a los resultados expuestos observamos una correlación entre los valores obtenidos por ambas metodologías pero muy sesgado según el laboratorio. Es decir, en general, aquellos laboratorios que informaron valores más bajos que la media con el ensayo de fumigación con cloroformo mostraron la misma tendencia con el uso del microondas.

Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de contar con patrones de referencia para poder comparar los resultados, independientemente de la metodología aplicada.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- ISO/IEC 13528 (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
- Jenkinson DS, Ladd JN (1981) Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In (Paul EA, Ladd JN eds.) Soil Biochemistry Vol. 5, Dekker, New York pp, 415-471.
- Norma IRAM SAGPyA N° 29571-2.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, D. S. Jenkinson (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass. Soil Biol Biochem 19:703-707.



# ANEXO I

## TABLAS

Tabla 1

Datos enviados por los participantes – Carbono de biomasa microbiana ( $\mu\text{g C g}^{-1}$  suelo)

Código Laboratorio	Cloroformo			Microondas		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1	397	332	346	242	242	235
2	323	278	168			
3*	159	131	149	113	38	63
4*	133	132	132			
5	207	182		154	134	
6	182	192	273	246	232	256
7	435	295	286	191	133	137
9	195	209	197	182	193	182
11	327	429	495	273	313	247
12	203	201	191			
13	217	161	187			

\* Los laboratorios informaron repeticiones de un mismo día

Tabla 2  
Métodos utilizados por los participantes

Código de Laboratorio	Cloroformo		Microondas			Filtrado y Digestión	
	Fumigación	Exposición	Potencia medida (J/s)	Suelo colocado en simultaneo en el microondas (g seco)	Exposición	El extracto fue digerido:	Equipamiento
1	Directo en tubo	30 minutos	557,9	45 g	64,5 segundos	Inmediatamente después del Filtrado	Estufa
2	Directo en tubo	30 minutos				Luego de conservado en heladera o freezer para su posterior digestión	Bloque seco
3	Al vacío	24 horas	285,9	7,5 g	2 minutos	Inmediatamente después del Filtrado	Estufa
4	Directo en tubo	30 minutos				Luego de conservado en heladera o freezer para su posterior digestión	Estufa
5(*)	Al vacío	24 horas				Inmediatamente después del Filtrado	Bloque seco
6	Directo en tubo	30 minutos	557,9	7,5 g	1 minuto	Inmediatamente después del Filtrado	Estufa
7	Directo en tubo	30 minutos	695,9	45 g (6 tubos con 7,5g c/u)	1 minuto	Inmediatamente después del Filtrado	Estufa
9	Directo en tubo	30 minutos	557,9	45 g (6 tubos con 7,5g c/u)	1 minuto	Luego de conservado en heladera o freezer para su posterior digestión	Bloque seco
11	Directo en tubo	30 minutos	627,6	45 g (6 tubos con 7,5g c/u)	57 segundos	Inmediatamente después del Filtrado	Bloque seco
12	Directo en tubo	30 minutos				Luego de conservado en heladera o freezer para su posterior digestión	Estufa
13	Al vacío	24 horas				Inmediatamente después del Filtrado	Bloque seco

(\*) El laboratorio no suministró la información en la planilla al momento de confección del informe. Se usó muestra seca, sin hidratación previa a la extracción de C.

Tabla 3 Parámetro z Carbono de Biomasa Microbiana - Cloroformo

Código de laboratorio	Media ugC g <sup>-1</sup> suelo	z
1	358	1,20
2	256	0,15
3	147	-0,96
4	132	-1,11
5	194	-0,48
6	216	-0,26
7	339	1,00
9	200	-0,42
11	417	1,80
12	198	-0,44
13	188	-0,54

| z | ≤ 2 satisfactorio, 2 < | z | < 3 cuestionable, | z | ≥ 3 no satisfactorio.

Tabla 4: Parámetro z Carbono de Biomasa Microbiana - Microondas

Código de Laboratorio	Media (ugC g <sup>-1</sup> suelo)	z
1	239	-0.71
3	71	1.64
5	144	0.63
6	245	-0.78
7	159	0.49
9	186	0.05
11	279	-1.24

| z | ≤ 2 satisfactorio, 2 < | z | < 3 cuestionable, | z | ≥ 3 no satisfactorio.

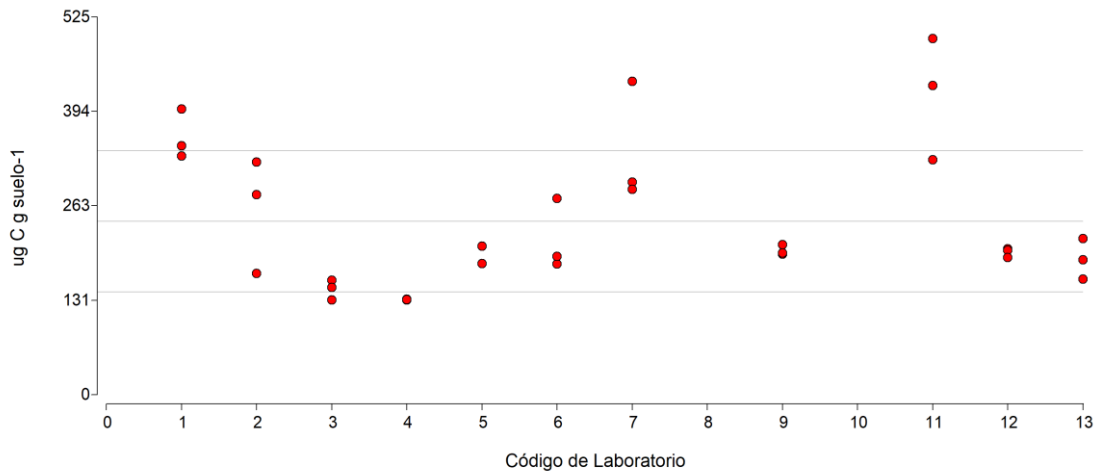


Figura 1: Valores informados por los laboratorios participantes. Las líneas perpendiculares al eje “y” indican la media entre laboratorios (241 ug C g<sup>-1</sup> suelo) y por encima y debajo de ésta, una unidad de desviación estándar entre laboratorios. Se informaron un total de 32 datos. El 80% de los valores están dentro del rango comprendido entre los valores de desviación estándar.

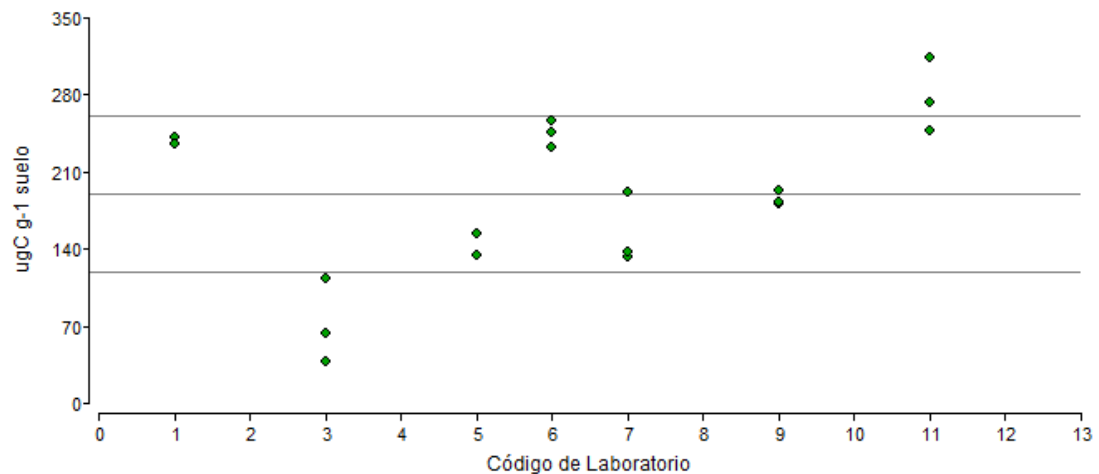
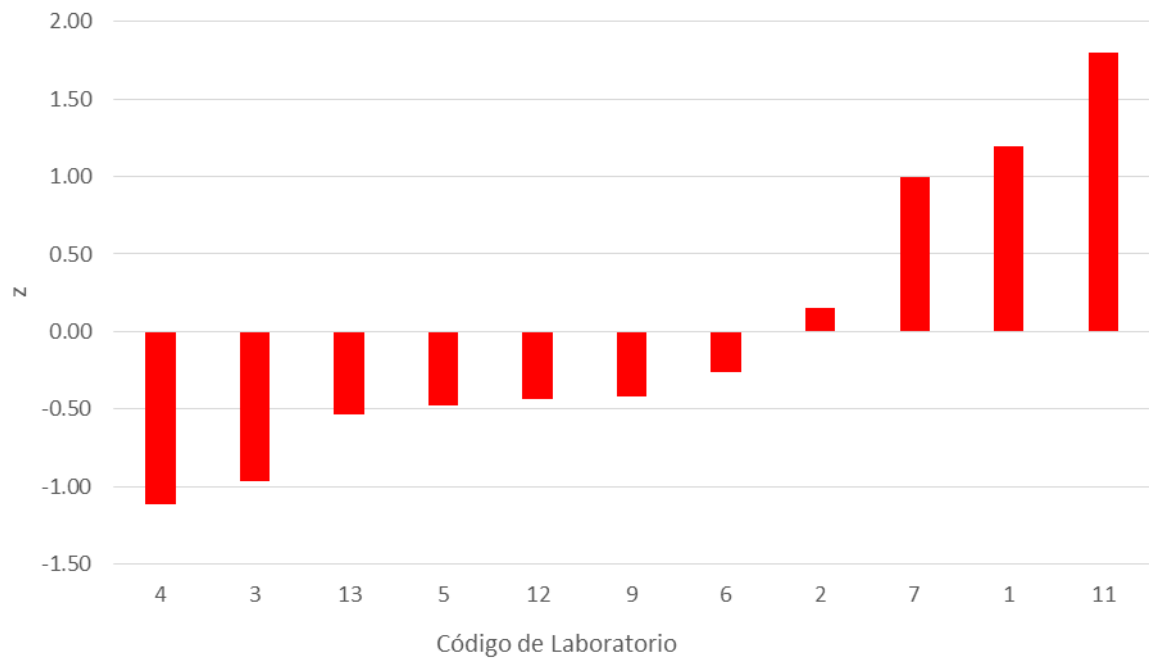
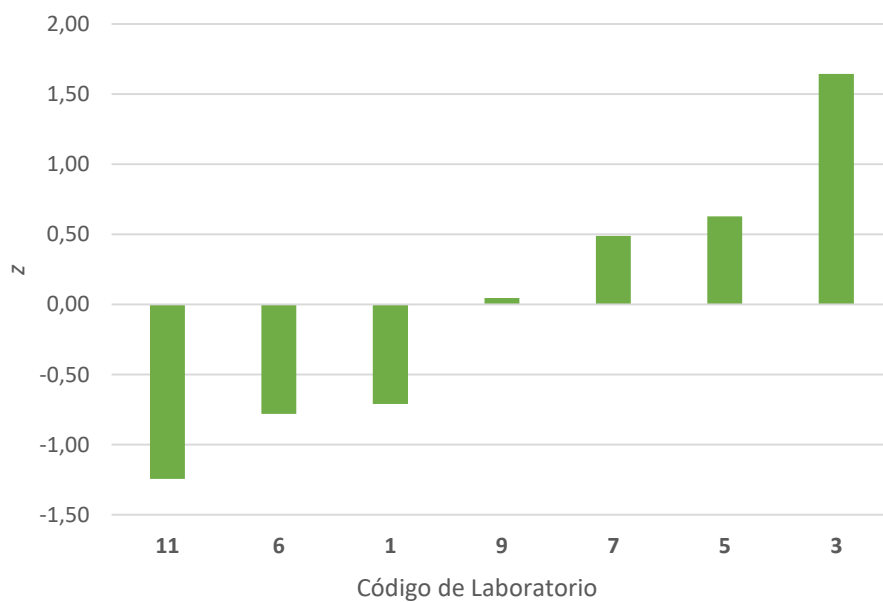


Figura 2: Valores informados por los laboratorios participantes. Las líneas perpendiculares al eje “y” indican la media entre laboratorios (190 ug C g<sup>-1</sup> suelo) y por encima y debajo de ésta una unidad de desviación estándar entre laboratorios. Se informaron un total de 20 datos. El 75% de los valores están dentro del rango comprendido entre los valores de desviación estándar.



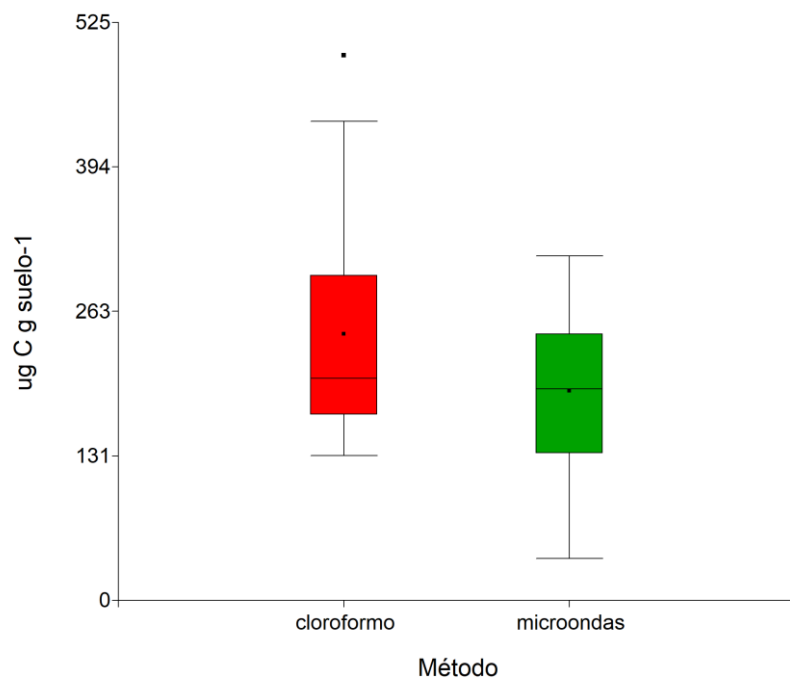
**Figura 3: Parámetro z Carbono de Biomasa Microbiana - Cloroformo**

$|z| \leq 2$  satisfactorio,  $2 < |z| < 3$  cuestionable,  $|z| \geq 3$  no satisfactorio.



**Figura 4: Parámetro z Carbono de Biomasa Microbiana - Microondas**

$|z| \leq 2$  satisfactorio,  $2 < |z| < 3$  cuestionable,  $|z| \geq 3$  no satisfactorio.



#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	metodo	Medias	p
CBM	cloroformo	241	0,1529
CBM	microondas	190	

Figura 5: Comparación entre metodologías. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el método de fumigación con cloroformo y el método con microondas según test Kruskal Wallis ( $p_{\text{valor}} > 0,05$ )

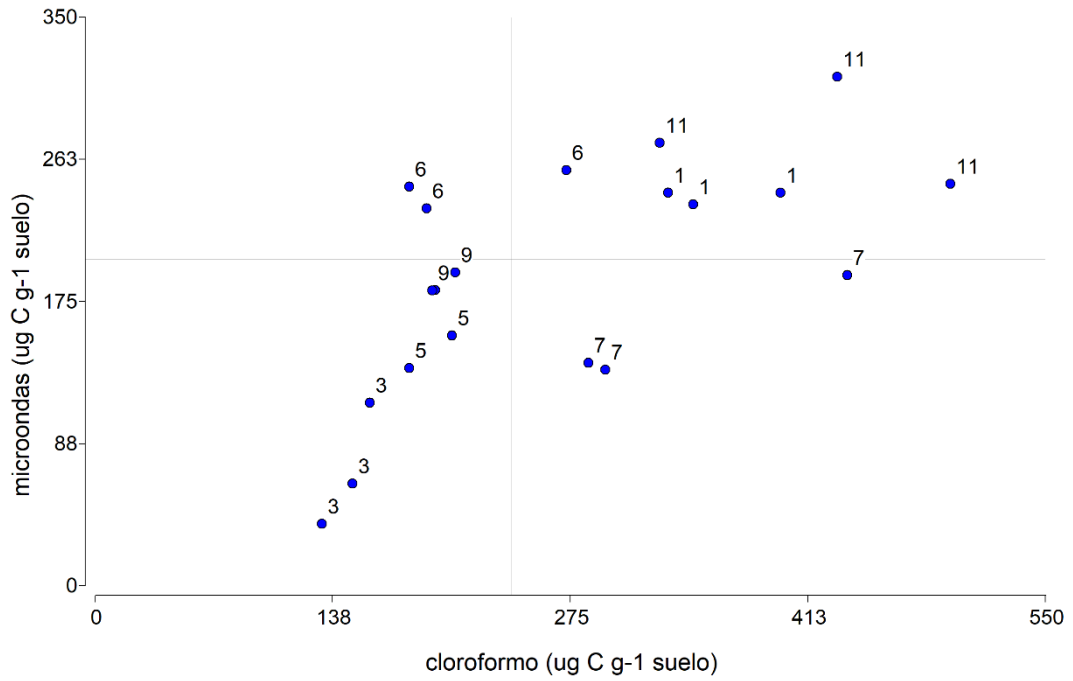


Figura 6: Diagrama de dispersión con los datos informados por los laboratorios que realizaron ambas metodologías. El número en cada símbolo indica el código de laboratorio. Las líneas perpendiculares a los ejes indican la media para cada metodología. Correlación de Pearson  $p < 0.001$ ,  $r = 0.64$

# ANEXO II



Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo

Pabellón Ingeis - Ciudad Universitaria - 1428 Buenos Aires - Argentina

INTERLABORATORIO COMISION BIOLOGIA DE SUELOS

ASOCIACION ARGENTINA DE LA CIENCIA DEL SUELO

CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA

POR FUMIGACION EXTRACCIÓN

TÉCNICA 3 2012

## 1.- Introducción

El carbono de la biomasa microbiana se define como “el carbono del suelo perteneciente a la microbiota, resultado del método de fumigación-extracción” (Brookes *et al.*, 1985; Vance *et al.* 1987; Gallardo, Schlesinger 1990) y valorado por dicromatometría (Page, 1982).

Se fumiga una alícuota de suelo humedecido con cloroformo como biocida y luego se extrae con  $K_2SO_4$  0,5M. En una alícuota del filtrado se determina carbono orgánico por espectrofotometría. El carbono de la biomasa microbiana se calcula por la diferencia entre la muestra fumigada y no fumigada, utilizando un factor de corrección denominado  $k_c$ . Los resultados, generalmente, se expresan en ppm, ya sea en  $\mu g C g^{-1}$  de suelo ó  $mg C kg^{-1}$  de suelo.

## 2. Metodología

### 2.1 Obtención del extracto

- Agregar a 7,5 g de suelo (ubicados en posición tipo pico de flauta para ampliar la superficie de mojado) 2,5 mL de agua destilada (relación 3:1 suelo:agua) en un tubo de centrifuga tipo Falcon de 50 mL de capacidad. Tapar en forma NO hermética (tapón apoyado, tapón sin roscar o tapón de aluminio).
- Incubar durante 15 hs  $\pm$  1h a 30°C en la oscuridad (estufa). Hacer 6 tubos por muestra.
- Fumigar tres tubos con 0,4 mL de cloroformo libre de etanol durante 30 min 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.
- Agregar a todos los tubos el extractante: 30 mL de sulfato de potasio P.A. 0.5 M y agitar 1 hora en agitador mecánico, acostando los tubos cerrados herméticamente.
- Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 15 min.
- Filtrar con papel de filtro banda azul y recoger el extracto en tubo de ensayo o envase limpio de C.



NOTA: los extractos se pueden guardar en heladera para su uso en los próximos dos-tres días o en freezer durante un tiempo prolongado.

NOTA; 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 de carbono de la biomasa microbiana (CBM), porque ello complica la determinación por espectrofotometría.

## 2.2 Determinación del C de la biomasa microbiana

- Agregar 4 mL del extracto con 1 mL de dicromato de potasio 0,0667 M y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 mL) en tubo de ensayo y pasar por vortex para homogeneizar y tapar.

NOTA: al tomar los 4 mL del extracto no arrastrar el mucílago en suspensión porque modificará la lectura en espectrofotómetro.

- Digerir a 140°C en la placa digestora o en estufa durante 30 minutos, tapando con bolita de cerámica (canicas) que actúa como válvula de reflujo.

NOTA: es muy importante mantener la temperatura mencionada.

- Dejar enfriar

- Agregar 1 mL de agua destilada.

NOTA: Si observa variaciones de densidad debe agitar 2-3 pulsos de vortex hasta que desaparezca esa imagen.

-Medir absorbancia en espectrofotómetro a 590 nm.

NOTA: si Ud. lee en transmitancia debe calcular la absorbancia. Absorbancia = 2 – log (%T)

## 2.3 Construcción de las curvas patrón

- Se puede referir a una curva patrón de glucosa o de bftalato de K.

### 2.3.1 Curva patrón de Biftalato de K o ftalato de K (es indistinto)

- Preparar la solución madre de biftalato de potasio que posea 3 g L<sup>-1</sup> de carbono (ver preparación de soluciones ítem ).

- Realizar diluciones según Tabla 1

- Tomar 4 mL de cada una de las soluciones hijas y proceder de idéntica forma a la muestra como se indica en el ítem 2.2 - Realizar la regresión lineal

Tabla 1. Soluciones hijas a partir de la solución madre para curva de calibración con biftalato de K

A. mL medidos de solución madre de biftalato de K	B. Volumen de agua destilada agregada a B (mL)	Concentración (g de C L <sup>-1</sup> )
0	100	0
0,5	99,5	0,015
1	99	0,03
1,5	98,5	0,045
2	98	0,06

### 2.3.2 Curva patrón de Glucosa

- Preparar la solución madre de glucosa secada en estufa que posea 3 g L<sup>-1</sup> de carbono (ver preparación de soluciones ítem 2.3.5).

- Realizar diluciones según Tabla 2

- Tomar 4 mL de cada una de las soluciones hijas y proceder de idéntica forma a la muestra como se indica en el ítem 2.2
- Realizar la regresión lineal

Tabla 2. Soluciones hijas a partir de la solución madre para curva de calibración con glucosa

A. mL medidos de solución madre de glucosa	B. Volumen de agua destilada agregada a B (mL)	Concentración (g de C L <sup>-1</sup> )
0	100	0
0,5	99,5	0,015
1	99	0,03
1,5	98,5	0,045
2	98	0,06

### 2.3.3 Cálculo de la ecuación a partir de la curva de calibración

La regresión lineal ajusta a la ecuación  $Y=a+b*x$

Siendo a=ordenada al origen (constante) y b la pendiente (g de C L<sup>-1</sup> de glucosa o biftalato de K).

Entonces:

$g \text{ de C L}^{-1} = (Y-a)/b$ ; siendo Y el valor de absorbancia leída.

### 2.3.4 Cálculo del C de la biomasa microbiana

- Calcular la cantidad de C (en g C L<sup>-1</sup>) de la muestra, con la lectura de absorbancia medidas en las muestras fumigadas y no fumigadas, por referencia a un gráfico de calibración de C de glucosa o de biftalato de K o de ftalato de K  $g \text{ C L}^{-1} = (\text{Absorbancia}-a)/b$ ; siendo a=ordenada al origen y b=pendiente (ver 2.3.3) - Transformar de g C L<sup>-1</sup> a ug C g de suelo<sup>-1</sup>, siendo:

$ug \text{ C g de suelo}^{-1} = ((g \text{ de C L}^{-1}) * 30 / 7,5) * 1000$  - Calcular el carbono de la biomasa microbiana, siendo:

$ug \text{ CBM g de suelo}^{-1} = \text{Fumigado (ug C g}^{-1}) - \text{No Fumigado (ug C g}^{-1}) / kc \text{ de } 0,35$  También:

$ug \text{ CBM g de suelo}^{-1} = \text{Fumigado (ug C g}^{-1}) - \text{No Fumigado (ug C g}^{-1}) / kc \text{ de } 0,45$  Este generalmente se usa para CBM por fumigación incubación.

NOTA: los factores de corrección kc son tomados de la bibliografía ya que para nuestros suelos aún no se los determinó.

### 2.3.5 Preparación de Soluciones

- Desecar los reactivos en estufa a 100°C durante una hora.

-Sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; PM 174,5) 0,5 M: preparar una solución de 87,250 g L<sup>-1</sup> de agua destilada. -Dicromato de potasio (K Cr O ; PM 294,2) 0,0667 M: preparar una solución de 1,992 g 100

2 2 7

mL<sup>-1</sup> de agua destilada.

- Curvas patrón: las soluciones madres deben contener 3 g C L<sup>-1</sup>

Biftalato de K (sinónimos: Ftalato de Potasio e Hidrógeno - Ftalato Acido de Potasio - Acido Ftálico, Sal de Potasio - Acido 1,2-Bencenodicarboxílico, Sal Monopotasio. KC<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>PM 204,220 g mol<sup>-1</sup>) preparar una solución madre de 6,382 g de Biftalato de K L<sup>-1</sup> de agua destilada.

Glucosa (PM 180 g mol<sup>-1</sup>): preparar una solución madre de 7,500 g Glucosa L<sup>-1</sup> de agua destilada.

### **3. Bibliografía**

Brookes, P.C., Landman A., Pruden G., 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 Biol. Biochem.* 22: 725-727.

Gallardo, A., Schlesinger W.H. 1990. Estimating microbial biomass nitrogen using the fumigation-incubation and fumigation-extraction methods in a warm-temperate forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 22: 927-932.

Page A.L. (ed.) 1982. *Methods of soil analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties.* Agronomy 9, ASA, SSSA, Madison, Wisconsin, USA. 1159 p.

Vance, E.D., Brookes P.C., Jenkinson D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703-707.

**CARBONO DE LA BIOMASA MICROBIANA POR FUMIGACIÓN EXTRACCIÓN Y  
MICROONDAS EXTRACCIÓN  
(COMO MÉTODO ALTERNATIVO)**

**Propuesta para tratamiento de muestras de suelo con microondas para estimación de C de biomasa microbiana**

**Acondicionamiento de la muestra previo al análisis (esto puede variar según la metodología)**

- Secar la muestra al aire (nunca en estufa ni aire forzado), tamizar por malla 2mm.
  - Pesar 7,5 g de suelo y agregar 2,5 ml de agua destilada ubicando en posición tipo pico de flauta para aumentar la superficie de contacto (relación 3:1 suelo:agua) en un tubo de centrífuga tipo Falcon de 50 ml de capacidad, tapando NO en forma hermética, sino solo apoyando, sin enroscar.
- En caso de suelos arenosos, hay que corregir los ml de agua a agregar. El concepto es que la muestra debe estar al 80% de la capacidad de campo.
- Incubar durante 15 h +/- 1 h a 30°C en la oscuridad en estufa (por ejemplo, colocar a las 18 h y sacarlos a las 9 am del día siguiente). Realizar 6 tubos por muestra.

**Tratamiento biocida con microondas**

Antes de aplicar el tratamiento de microondas es importante medir la potencia REAL a la cual trabaja el microondas (ej. Islam y Weil 1998, Bertozzi et al., 2019):

- 1- Colocar 1 litro de agua destilada en un recipiente de vidrio (ejemplo: vaso de precipitado o cualquier recipiente)
- 2- Registrar la temperatura del agua (recomendado 22°C)
- 3- Colocar el recipiente con el agua dentro del microondas en el centro de la bandeja y ponerlo en funcionamiento a **POTENCIA MAXIMA** por 1 minuto. Se sugiere usar un cronómetro para controlar el tiempo y verificar que el timer del microondas coincida con lo esperado. De lo contrario, deberá apagarse una vez que se cumpla el tiempo según lo que indique un cronómetro de precisión.
- 4- Registrar la temperatura del agua al retirarlo del microondas.
- 5- Calcular la potencia real del microondas utilizando la fórmula:

$$P = \frac{Cp K T m}{t}$$

Siendo:

P: Potencia absorbida por la masa de agua en Joules por segundo ( $J s^{-1}$ ) Cp(\*): capacidad térmica del agua, es igual a 1 ( $cal mL^{-1} °C^{-1}$ ).

K: factor (4.184) para convertir  $cal mL^{-1} °C^{-1}$  a watts ( $J s^{-1}$ );

T : La diferencia entre la temperatura inicial y la temperatura final del agua ( $°C$ ) m: masa del agua en gramos (g)

t: tiempo de duración en segundos de la radiación del microondas aplicada (s)

(\*)En condiciones normales 1 kilogramo de agua necesita 1 kilocaloría para que su temperatura aumente 1°C.

Una vez que se obtiene el valor P de su equipo (Joules por segundo,  $J s^{-1}$ ) se debe hacer el cálculo para aplicar a las muestras la cantidad recomendada de microondas para su tratamiento. Por ejemplo,  $800 J g^{-1}$  suelo (según bibliografía citada en las referencias al final de este documento)

#### 4. EJEMPLO

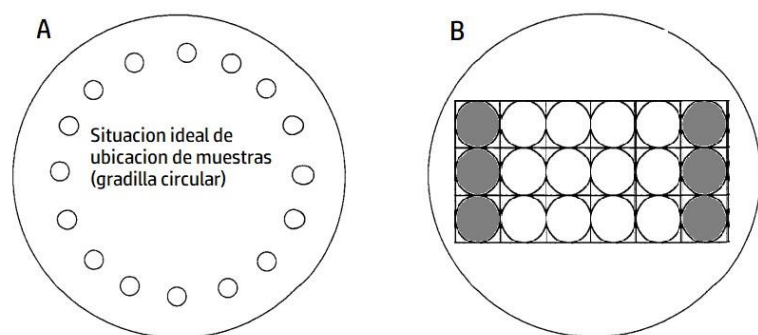
Estimación de biomasa microbiana para dos situaciones: suelo prístino (SP) y suelo agrícola (SA), por triplicado

- Si la potencia máxima del microondas es igual a  $557,86 J s^{-1}$  (esa es la que medimos en nuestro equipo) y colocamos 6 tubos con 7,5 g de suelo cada uno, necesitamos una potencia de 36000 J para lograr los  $J g^{-1}$  suelo ( $6 \text{ tubos} \times 7,5 \text{ g} \times 800 \text{ J}$ ). Por regla de tres simple: *Si 557,86 J se da en 1 segundo, para aplicar 36000 J se va a requerir 64,5 segundos en el microondas (~1 min)*
- Es importante chequear que la temperatura alcanzada por los tubos sea uniforme, es decir que reciban la misma radiación. Por lo que se sugiere que al finalizar el tratamiento se mida la temperatura alcanzada en cada tubo, para descartar posibles irregularidades en la distribución del calor.
- Teniendo en cuenta este cálculo, colocar 6 tubos en el microondas durante el tiempo calculado a potencia máxima, reservar los 6 tubos quedan fuera del microondas y constituyen los “no fumigados”.

NOTA: colocar los tubos en el margen de la bandeja, no ponerlos en el centro porque recibirán más radiación que los que estén más alejados (Figura 1, adaptado de Wang et al., 2001). Tener precaución de no utilizar gradillas metálicas. En caso de no contar con gradillas como en el esquema de Figura 1, se sugiere utilizar vasitos de precipitado para cada tubo falcon por separado y ubicarlos al margen de la bandeja, homogéneamente distribuidos.

a) Distribución de muestras de manera uniforme en el margen de la bandeja del microondas.

b) Adaptación con gradilla rectangular colocando un máximo de 6 muestras por tanda en los extremos (sombreado)



**Figura 1: Distribución de las muestras en la bandeja del microondas para distribución homogénea de la temperatura en cada muestra. En este caso, las muestras se colocan en tubos falcon de 50 ml.**

Luego del tratamiento con microondas se prosigue con la extracción del C y cuantificación.

## Referencias

- Bertozzi, J., Andrade, D. S., Oliveira, C. C., Bala, A., & Caviglione, J. H. (2020). Microwave assisted biocidal extraction is an alternative method to measure microbial biomass of carbon from cultivated and non-cultivated soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(1), 255-263.
- De Araujo, A. S. F. (2010). Is the microwave irradiation a suitable method for measuring soil microbial biomass?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(4), 317-321.
- Islam, K. R., & Weil, R. R. (1998). Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biology and Fertility of Soils*, 27(4), 408-416.
- Wang, W., Dalal, R. C., & Moody, P. W. (2001). Evaluation of the microwave irradiation method for measuring soil microbial biomass. *Soil Science Society of America Journal*, 65(6), 1696-1703.