

VALIDACIÓN DE MÉTODO DE RESPIRACIÓN POTENCIAL EN UN SUELO PATAGÓNICO: IRGA VS TRAMPAS DE NaOH

Díaz Leviante, M¹, A.S. Enriquez^{2,*}, M. Gonzalez Polo^{3,*}

¹ Universidad Nacional de Río Negro;

² Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INTA-CONICET),

* Modesta Victoria 4450, Bariloche, Río Negro, enriquez.andrea@inta.gob.ar.

³ INIBIOMA, CONICET-UNCO, * Quintral 1250, Bariloche, Río Negro

RESUMEN

Las actividades humanas aumentaron las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera provocando un calentamiento adicional de la superficie y atmósfera terrestre, con consecuencias sobre los ecosistemas naturales y la humanidad. Esto motiva la investigación acerca de las emisiones de GEI desde los ecosistemas y particularmente desde el suelo, dado que contiene más del doble de carbono que la atmósfera. El objetivo del presente trabajo es comparar la adecuación de dos métodos analíticos ampliamente utilizados para la evaluación de la respiración microbiana potencial del suelo (IRGA vs. Trampas de NaOH) en Aridisoles de la estepa patagónica y analizar la variación en los resultados en función del tiempo y temperatura de almacenamiento posterior al muestreo de los mismos. Las muestras de suelo utilizadas para el estudio se tomaron en el Campo Experimental Anexo de INTA ubicado en Pilcaniyeu en cuatro momentos: 2016 y 2020 (almacenados secos a temperatura ambiente), 2021 (almacenados a 4°C) y 2022 (fresca). Las incubaciones del suelo se realizaron en laboratorio en condiciones óptimas de humedad (60% capacidad campo) y temperatura (25°C), y en oscuridad. Los valores de respiración potencial máxima estimados para cada técnica presentaron diferentes magnitudes pudiendo esto deberse a una subestimación o sobrestimación de la tasa de respiración del método, respectivamente. Independientemente de la técnica utilizada, los valores de respiración obtenidos para los diferentes años no se encontraron estadísticamente afectados por su antigüedad. Los resultados indican que la técnica del IRGA es una buena opción para estimar respiración en suelos pobres con bajas emisiones potenciales debido a su practicidad, menor tiempo invertido para obtener resultados y mayor sensibilidad con respecto al método de trampas.

Palabras clave: respiración microbiana, patagonia norte, incubación de suelo

INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han aumentado las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera, lo cual genera consecuencias sobre los ecosistemas naturales y la humanidad. Esto motiva la investigación acerca de las emisiones de GEI como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) desde los ecosistemas.

La superficie del suelo libera CO₂ como resultado de los procesos de respiración, que comprenden la oxidación bioquímica de los compuestos de carbono (C) realizada por microorganismos, en mayor medida, y la respiración de organismos edáficos, raíces e hifas micorrícicas (Vásquez et al., 2013). Esta tasa de producción de CO₂ indica la tasa de descomposición de la materia orgánica del suelo y en consecuencia, la cantidad de C que se pierde del sistema. Estimar la respiración del suelo ayuda a determinar la contribución de este al balance del CO₂ en la atmósfera (Burbano Orjuela, 2018), de gran relevancia dado que el suelo contiene más del doble de C que la atmósfera (Cuevas Rodriguez et al., 2012).



Para evaluar las emisiones de CO₂, pueden realizarse experimentos en laboratorio bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y luz. Este tipo de ensayo se lleva a cabo en incubadoras con cámaras cerradas de vidrio tomando muestras de gas desde ellas y analizando la concentración de CO₂ acumulada (García Izquierdo et al., 2003). Para ello, se pueden emplear técnicas como la del IRGA o trampas de NaOH. Si bien se recomienda realizar los ensayos de respiración en muestras frescas, son pocos los estudios donde se evalúa el efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento en las mediciones de emisión de CO₂, influencia que puede variar de acuerdo al tipo de suelo, (Lee et al., 2007). Esto resulta útil para estimar la representatividad en las emisiones obtenidas si se analizaran muestras almacenadas en diferentes condiciones. El objetivo del presente trabajo es comparar la adecuación de dos métodos analíticos ampliamente utilizados para la evaluación de la respiración microbiana potencial (R_{max}) (IRGA vs. Trampas de NaOH) en suelos Aridisoles de la estepa patagónica y analizar la variación de los resultados en función del tiempo de muestreo de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio a campo se realizó en el Campo Experimental Anexo de INTA ubicado en Pilcaniyeu (41°02' 9.5" S; 71°31' 21.5" O) a 1070 m.s.n.m. El paisaje está dominado por estepas graminoso-arbustivas, con predominio de suelo clasificado como Aridisol. La zona cuenta con un régimen hídrico semiárido, con inviernos fríos y húmedos, veranos templados y secos, y fuertes vientos (Gaitán et al. 2019). La temperatura media anual es 7,7°C y la precipitación media anual es 258 mm (período 1986-2013) concentrada un 70% en otoño e invierno (Fariña, 2018).

Las muestras de suelo compuestas de 3 submuestras, fueron recolectadas en la zona de inter-parche no vegetado, a 0-10 cm de profundidad, en cuatro momentos: 2016 y 2020 (almacenadas secas a temperatura ambiente), 2021 (almacenadas a 4°C) y 2022 (fresca).

El trabajo de laboratorio se llevó adelante en el Laboratorio de Suelos y Aguas de INTA EEA Bariloche (ensayos IRGA) y en el Laboratorio de Suelos del CRUB-UNCO (ensayos trampas NaOH).

Medición IRGA

Se utilizaron frascos de 213 cm³ con tapa de cierre hermético. La tapa se conectó de manera hermética a un venteo con tapón y a un sistema de llave de tres vías.

Para la preincubación, se colocaron 30 g de suelo húmedo al 60% de su capacidad de campo y se preincubó a 25°C en ausencia de luz durante 5 días, con venteo abierto para permitir oxigenación (la humedad se rectificó durante la preincubación).

Para la toma de muestras de aire, los suelos se incubaron 2:30 h, 5 h, 7 h, 23 h, 48 h, 72 h y semana 1 a 16 en condiciones similares a las de la preincubación pero con venteo cerrado. Finalizado el período de incubación, se extrajo una alícuota de gas del interior del frasco con una jeringa de 30 ml, que se inyectó en el analizador Infra-Red Gas Analyzer (IRGA) EGM-4 de PP-systems, a razón de 5 ml/seg en modo estático. Al terminar la medición se destaparon los frascos durante unos minutos para renovar la atmósfera de aire y así evitar problemas de anaerobiosis y diferencias de presiones parciales. Se cerraron previo al nuevo período de incubación, registrando la hora de cierre.

A todos los datos obtenidos se les restó el blanco, el cual fue calculado a partir del promedio de dos mediciones: Una muestra de un frasco vacío tapado al finalizar cada medición y una muestra del aire del laboratorio para conocer la concentración de CO₂ al momento de cierre.

Se utilizó la siguiente fórmula para realizar los cálculos:

$$\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo seco} = \frac{P \cdot V}{R \cdot T} * \frac{P}{G} \text{ (García Izquierdo et al., 2003)}$$



P: Presión [atm]

V: $\frac{\text{Volumen frasco} \cdot \text{medición IRGA en ppm}}{10^6}$

T: Temperatura [K]

R: Constante de gases ideales [0,082 atm · m³ · mol⁻¹ · K⁻¹]

p: 12000 mg equivalentes a 1 mol de CO₂

G: Factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizado en el ensayo. [kg]

Medición NaOH

Se utilizaron frascos de 1,5 L dentro de los cuales se colocaron 100 gramos de suelo a 60% de capacidad de campo con 10 mL de solución de NaOH (0,5 N), y un recipiente con agua. Se sellaron herméticamente con cinta e incubaron en un cuarto a 25°C en ausencia de luz.

Previamente, se realizó una preincubación de las muestras de suelo en las condiciones antes descritas (humedad, temperatura y ausencia de luz) durante 5 días.

Como blancos se utilizaron frascos que únicamente contenían agua y la solución de álcali.

El NaOH se repuso según el cronograma de medición a las semanas 1, 2, 4, 8 y 16. Se determinó el CO₂ absorbido indirectamente por medio de una titulación del exceso de NaOH con ácido clorhídrico (HCl) 0,5N, precipitando los carbonatos con cloruro de bario (BaCl₂), usando fenolftaleína como indicador. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Se utilizó la siguiente fórmula para realizar los cálculos:

$$\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo seco} = \frac{(B-S) \cdot N \cdot 6}{G} \quad (\text{García Izquierdo et al., 2003})$$

B: Volumen medio de HCl empleado en la valoración de los blancos.[ml]

S: Volumen de HCl empleado en la valoración de las muestras de suelo.[ml]

N: Normalidad exacta de HCl utilizado en la valoración.

6: Factor de conversión considerando el peso equivalente del CO₂ [22 mg/meq] según la relación estequiométrica y el peso del C presente en la molécula de CO₂ [12 mg/44 mg]

G: Cantidad de suelo seco utilizado en el ensayo [kg]

Análisis de datos

Se determinó el punto de inicio de la fase estacionaria mediante el ajuste de los datos acumulados al modelo Gompertz, transformando los datos de emisión acumulada a logaritmo en base 10 e incorporándolos al programa estadístico R. El valor de la asíntota horizontal obtenida se definió como la máxima emisión potencial y se registró el número de días necesarios para alcanzar este punto de acuerdo a cada técnica.

A fin de determinar las diferencias significativas en el comportamiento de la media de cada curva, de acuerdo a cada año, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con p <0,05; y la prueba Tukey con un nivel de significancia de p <0,05. Para comparar los datos de emisión potencial máxima de cada técnica se realizó una regresión lineal.

Análisis realizados en el programa Prism4 (GraphPad, San Diego, CA, USA), utilizando el ajuste global (Motulsky y Christopoulos, 2004).

En el ensayo de las trampas de NaOH se utilizó la Prueba de Q, un test estadístico utilizado para n<10 a fin de descartar datos anómalos en las repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo IRGA

Se confeccionaron las curvas con los valores acumulados de emisión de CO₂ (Figura 1A) durante 112 días (16 semanas) donde se consideró el inicio de la fase estacionaria entre los 14 y los 21 días. En este punto



se obtuvieron como resultados: $8,1 \pm 2,2$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $11,9 \pm 4,1$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $20,7 \pm 8,1$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $22,1 \pm 20,2$ mg C-CO₂ kg⁻¹ de emisión potencial máxima para los años 2016 y 2020 temperatura ambiente, 2021 refrigerada a 4°C y 2022 fresca, respectivamente (Figura 2A).

Se consideró únicamente el inicio de la fase exponencial hasta el comienzo de la fase estacionaria para el análisis ANOVA entre las curvas de cada año. Las curvas para los cuatro años analizados difirieron levemente, hallando diferencias estadísticamente significativas solo entre las del año 2016 temperatura ambiente y 2021 refrigerada a 4°C. La curva del año 2022 fresca presentó una gran variabilidad en los datos, abarcando al resto de los años.

Ensayo Trampas de NaOH

La fase estacionaria comenzó a partir de los días 28 a 56 y se obtuvieron los siguientes valores: $191,2 \pm 22,4$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $252,3 \pm 40,8$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $529,6 \pm 212,3$ mg C-CO₂ kg⁻¹; $185,5 \pm 41,0$ mg C-CO₂ kg⁻¹ para los años 2016 y 2020 temperatura ambiente, 2021 refrigerada a 4°C y 2022 fresca, respectivamente (Figura 2B). No se hallaron diferencias entre las cuatro curvas analizadas para el rango que comprende el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria.

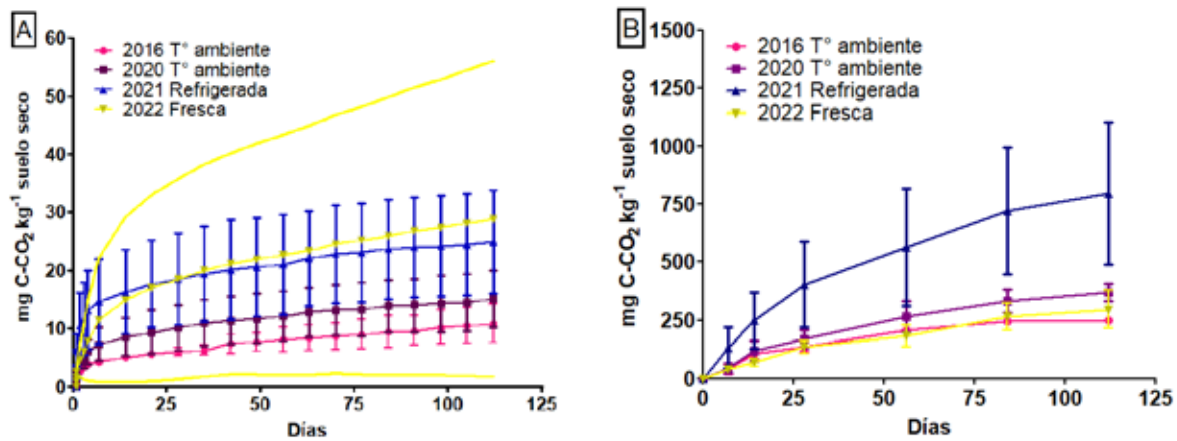


Figura 1: Curvas de evolución del CO₂ respiración acumulada de suelo (mg de C-CO₂ kg⁻¹ ss) durante 112 días de incubación utilizando A) IRGA y B) Trampas de NaOH para los suelos muestreados en diferentes momentos y almacenados en distintas condiciones.

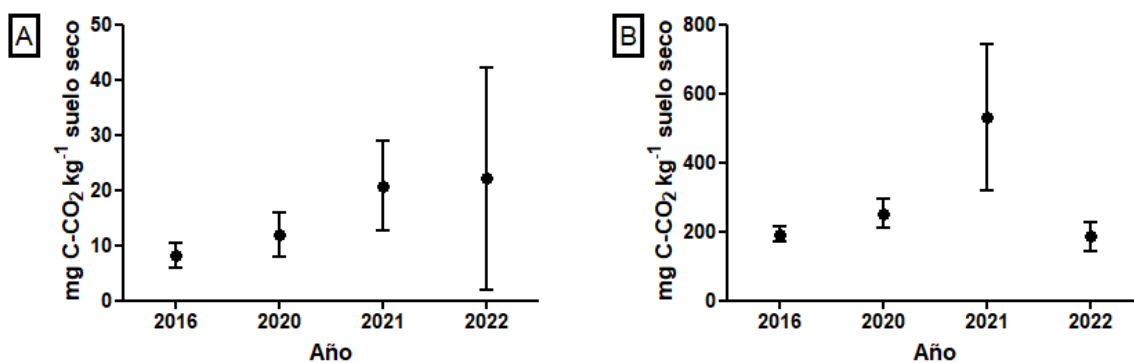


Figura 2: Valores de respiración potencial máxima (\pm Desvío estándar) obtenidos en A) ensayo del IRGA entre los 14 y 21 días de incubación y B) Ensayo de trampas de NaOH entre los 28 a 56 días de incubación.



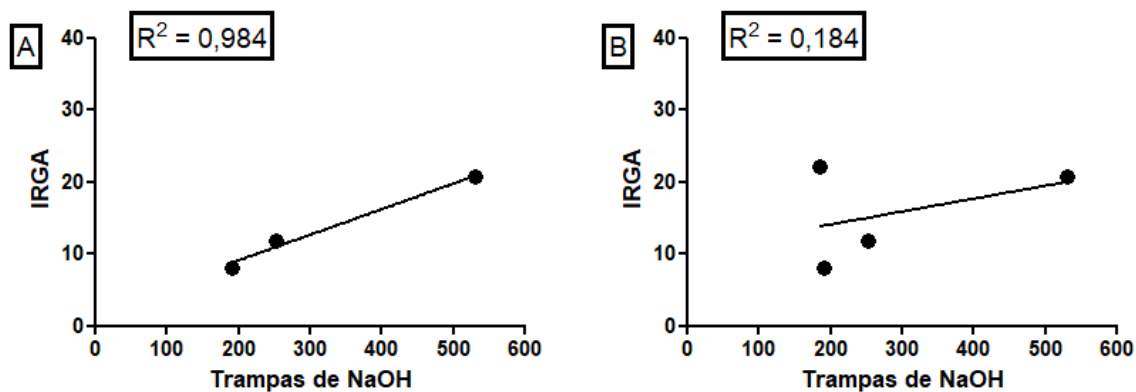


Figura 3: A) Aproximación lineal de las emisiones potenciales máximas obtenidas para los años 2016, 2020 y 2021. B) Aproximación lineal de las emisiones potenciales máximas obtenidas para los años 2016, 2020, 2021 y 2022.

Se encontró una correlación muy alta ($R^2 = 0,984$, 95% de confianza, Figura 3A), al no considerar el año 2022 fresca, relación que se elimina al sumarlo al análisis (Figura 3B).

Al observar la variabilidad de los valores para el año 2022 (fresca) en la técnica del IRGA y la baja emisión en comparación con los demás años, en el caso de las trampa, se considera que es necesario profundizar y seguir investigando este caso en particular.

Finalmente, y dado las diferencias halladas entre ambas técnicas, principalmente en las magnitudes de emisión, se compararon sus características (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre las técnicas empleadas para analizar respiración potencial de CO_2 de un Aridisol incubado en laboratorio: IRGA y Trampas de NaOH.

	IRGA	Trampas de NaOH
Límite de detección	695 ppm 2,4 mg C-CO ₂ kg ⁻¹ ss	9774 ppm 72 mg C-CO ₂ kg ⁻¹ ss
Precisión	1ppm 0,0035 mg C-CO ₂ kg ⁻¹ ss	0,1 ml 3 mg C-CO ₂ kg ⁻¹ ss
Resolución/Sensibilidad	Mayor	Menor
Ventajas	Mediciones instantáneas de la concentración de CO ₂ que permiten mayor rapidez, agilidad y capacidad de replica	Método fácil y ampliamente utilizado
Desventajas	Algunos estudios sugieren que las cámaras estáticas cerradas pueden sobrestimar o subestimar las tasas de respiración del suelo (Cueva-Rodríguez et al., 2012).	Podría presentar subestimación de la medida de CO ₂ cuando este es elevado y sobreestimación cuando es baja (Luo & Zhou, 2010).
Tiempo para obtener Rmax	14 días - 21 días	28 días - 56 días

Tiempo de ejecución	80 muestras h ⁻¹	18 muestras h ⁻¹
Costo	Analizador de gases infrarrojo costoso	Económico

Se observa una menor resolución en las trampas de NaOH respecto del IRGA dado los límites de detección y la precisión determinada. La sensibilidad de la técnica de trampas NaOH sería baja para suelos Aridisoles de la estepa de Patagonia Norte, con bajo contenido de materia orgánica, baja disponibilidad hídrica y textura gruesa, que se traduciría en una reducida tasa de emisión potencial de CO₂. No se descarta la posibilidad de que el método del IRGA presente una subestimación (Cueva-Rodríguez et al., 2012) por lo cual ambas técnicas no presentan los mismos resultados en cuanto a magnitudes.

CONCLUSIONES

Considerando a la muestra fresca como referencia, se concluye que la respiración microbiana en suelos de estepa de Patagonia norte no se vería significativamente afectada por su antigüedad, aunque hay una tendencia hacia una reducción de actividad con el paso del tiempo. Por tanto, podrían utilizarse muestras extraídas con al menos 6 años de antelación y almacenadas a temperatura ambiente o refrigeradas, para estimar los valores de respiración potencial en laboratorio.

Concluimos que para el estudio de suelos provenientes de zonas áridas y semiáridas la técnica del IRGA es una buena opción debido a su practicidad, menor tiempo necesario para obtener resultados y su mayor sensibilidad respecto del método de las trampas de NaOH.

BIBLIOGRAFÍA

- Burbano-Orjuela, H. (2018). El carbono orgánico del suelo y su papel frente al cambio climático. *Rev. Cienc. Agr.* 35(1): 82-96. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.183501.85>. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcia/v35n1/0120-0135-rcia-35-01-00082.pdf>
- Cueva-Rodríguez, A., Yépez, E. A., Garatuza-Payán, J., Watts, C. J., & Rodríguez, J. C. (2012). Diseño y uso de un sistema portátil para medir la respiración de suelo en ecosistemas. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 327-336.
- Fariña, C. (2018). Pastoreo intensivo en distintas estaciones del año: efectos a escala de planta y de comunidad en una estepa de Patagonia Norte. Tesis de Maestría en Recursos Naturales, Escuela para Graduados Alberto Soriano -Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires.
- Gaitán JJ, Bran DE, Oliva GE, Stressors PA (2019) Patagonian desert. *Encyclopedia of the World's Biomes*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands 163–180.
- García Izquierdo, C., Gil Sotres, F, Hernández Fernández, T., & C, Trasar Cepeda. (2003). Técnicas de Análisis de Parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa (Ed. Española).
- Lee, Y. B., Lorenz, N., Dick, L. K., & Dick, R. P. (2007). Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Science Society of America Journal*, 71(4), 1299-1305.
- Luo, Y., & Zhou, X. (2010). *Soil respiration and the environment*. Elsevier. Recuperado de: <https://www.elsevier.com/books/soil-respiration-and-the-environment/luo/978-0-12-088782-8>
- Vásquez, José Rafael, Macías, Felipe, & Menjivar, Juan Carlos. (2013). Respiración del suelo según su uso y su relación con algunas formas de carbono en el Departamento del Magdalena, Colombia. *Bioagro*, 25(3), 175-180. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000300004&lng=es&tlng=e

