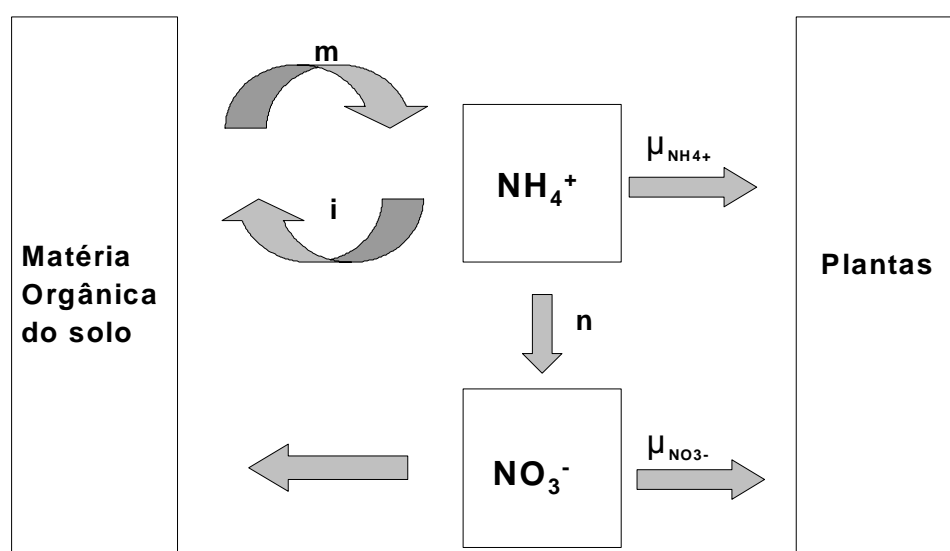


UTILIZACION DE ¹⁵N EN ESTUDIOS DE LOS FLUJOS BRUTOS DE NITROGENO EN EL SUELO

Cecilia del Carmen Videla¹

INTRODUCCION

A pesar que el nitrógeno (N) es el nutriente de mayor demanda para sustentar la producción de las plantas y, por lo tanto, ha sido ampliamente estudiado en investigaciones relacionadas a agroecosistemas, aún permanecen diversas “cajas negras” en el conocimiento de su dinámica. Aún en las representaciones simplificadas del ciclo del N en el sistema suelo-planta como la presentada en la Figura 1, están involucrados seis procesos simultáneos e interdependientes y cuatro fracciones o *pooles*.



m = mineralización; i = inmovilización; $\mu_{NH_4^+}$ = tasa de mineralización; $\mu_{NO_3^-}$ = tasa de nitrificación

Figura 1. Ciclo del nitrógeno simplificado en el sistema suelo-planta (Barracough, 1991).

El ciclo interno del N consiste de procesos que convierten N de una forma química a otra, o transfieren N entre distintos *pooles* del ecosistema. Este ciclo interno incluye la absorción de N por las plantas, el retorno de N al suelo en forma de residuos vegetales de la parte aérea y de las raíces, la mineralización de N (conversión de N orgánico a inorgánico), la inmovilización microbiana de N (consumo de N inorgánico por los microorganismos) y la nitrificación (producción de nitrito - nitrificación - a partir de amonio y de nitrato -nitrificación - a partir de nitrito). Los movimientos de N en este sistema son mediados por la actividad de comunidades de microorganismos que, a su vez, son afectados por las condiciones ambientales, principalmente por la temperatura y la humedad del suelo, así como por el pH y la reserva de C-orgánico en el suelo.

Las mediciones simples de cambios en los tamaños de los *pooles* no ofrecen explicaciones sobre los flujos de entrada y salida desde un *pool* a otro, ya que, por ejemplo, el amonio del suelo está sujeto a

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP.C.C. 276, 7620 Balcarce, Argentina. Tel. 02266-439100 int. 394.
Correio electrónico: cvidela@balcarce.inta.gov.ar

procesos de consumo (inmovilización, nitrificación, fijación en las arcillas, volatilización) y de producción (mineralización). Desde el punto de vista de la producción agrícola, los efectos netos de la actividad heterotrófica de la microbiota del suelo en el ciclaje del N fueron ampliamente estudiados (mineralización e inmovilización netas), a pesar que en términos de biología de suelo, bioquímica y ecología, los estudios de los procesos netos no reflejen lo que realmente está ocurriendo en el sistema. Por ejemplo, una baja tasa de mineralización neta puede ser producto de una baja actividad biológica total en el ecosistema (Situación 1 de la Figura 2), o puede ser el resultado de una alta actividad de procesos que trabajan en sentidos opuestos, es decir, mineralización e inmovilización bruta muy activas (Situación 2 de la Figura 2). Cabe aquí preguntarse: ¿las plantas que crecen en estas dos situaciones tienen la misma disponibilidad de N?, ¿qué es lo que las plantas “perciben”, la cantidad bruta o la neta de N mineralizado?.

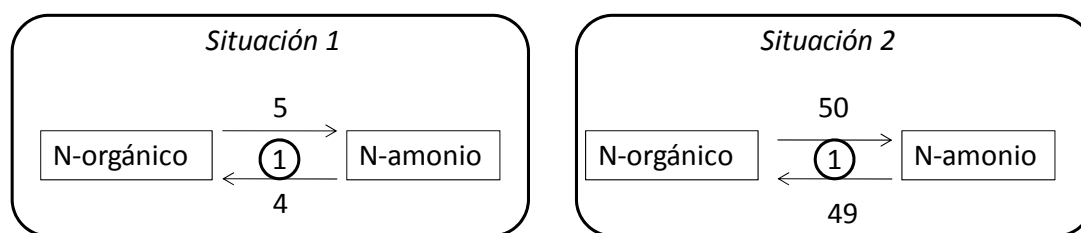


Figura 2. Esquemas del proceso de mineralización neta en dos situaciones contrastantes. Adaptado de Myrold, 2004).

El cambio neto en el N mineral fue usado históricamente como indicador de la disponibilidad de N *in situ* del suelo (Hatch et al., 1990, Stenger et al., 1995). No obstante, estos valores de mineralización son el resultado neto de combinaciones de tasas brutas de los procesos que componen el ciclo del N, particularmente amonificación, inmovilización y nitrificación. En los últimos años, varios estudios que utilizaron el isótopo ^{15}N demostraron que la mineralización y la inmovilización bruta, que determinan la disponibilidad de N, son importantes y parcialmente independientes entre sí (Schimel, 1986, Davidson et al., 1991). La estimación de los flujos brutos de N en el suelo permite comprender mejor los procesos que gobiernan el ciclo del N y, consecuentemente, la disponibilidad de N para las plantas.

Posibilidades metodológicas para medir las transformaciones brutas del nitrógeno

El empleo de técnicas isotópicas permite evaluar las transformaciones individuales del N en el suelo, así como las múltiples transformaciones que ocurren simultáneamente en el sistema suelo-planta. Mediante la utilización de este método es posible marcar simultáneamente el camino de los dos isótopos estables del N (^{15}N y ^{14}N), produciendo información sobre el sistema y estimando las tasas de transformaciones del N.

Las técnicas con trazador ^{15}N que pueden usarse en estudios de los procesos de transformaciones brutas de N en el suelo pueden agruparse de la siguiente forma (Hart et al., 1994):

- Técnicas de abundancia natural de ^{15}N . Aprovechan leves diferencias en enriquecimiento de ^{15}N en *pooles* del suelo, resultantes de la discriminación biológica durante un largo período para evaluar las relaciones sustrato-producto a largo plazo.
- Técnica del trazador ^{15}N . Se enriquece con ^{15}N un *pool* sustrato o fuente y se monitorea cuali o cuantitativamente el movimiento del isótopo a través del tiempo.
- Técnica de dilución del isótopo ^{15}N . Se enriquece con ^{15}N un *pool* producto y se monitorea la tasa a la cual la producción altera el enriquecimiento isotópico de ese *pool*.

La técnica de abundancia natural ha sido muy poco utilizada, ya que demanda altos costos para los análisis de ^{15}N de alta precisión puesto que deben medirse diferencias muy pequeñas, además que deben conocerse los valores de las constantes de fraccionamiento. La técnica del trazador tiene, al menos, tres inconvenientes en la determinación de las tasas de procesos brutos, a saber: incrementa el tamaño del *pool* sustrato, con la probabilidad asociada de estimular el proceso en estudio conduciendo a sobreestimaciones; es posible que ocurra flujo de nuevo material al *pool* sustrato marcado, diluyéndolo y produciendo una subestimación o, consumo del *pool* producto que también conduce a subestimación.

La técnica de dilución del isótopo ^{15}N

La técnica de dilución del isótopo ^{15}N es la más utilizada porque es la única herramienta disponible para estimar los flujos brutos de N independiente de los procesos que consumen NH_4^+ , razón por la cual está siendo usada intensamente (Barraclough & Puri, 1995; Gava, 2003; Accoe et al., 2004). Esta técnica se basa en la dilución de la abundancia de ^{15}N en el *pool* NH_4^+ marcado inicialmente con ^{15}N , por el $^{14}\text{NH}_4^+$ proveniente de la mineralización de la materia orgánica (MO). El marco teórico que sustenta esta técnica fue desarrollado por Kirkham y Bartholomew (1954, 1955), pero fue poco utilizada en esa época debido al alto costo de los análisis de ^{15}N y también a que la formulación de las ecuaciones imponía condiciones restrictivas para su aplicación. A partir de mediados de la década de los '80, las ecuaciones fueron simplificadas, removiéndose algunas restricciones, lo que hizo más accesible la metodología. También el desarrollo de la espectrometría de masa automatizada por combustión disminuyó el costo de los análisis, por lo que en los últimos años se desarrollaron una mayor cantidad de trabajos sobre el tema.

Barraclough et al. (1985) y Nishio et al. (1985) publicaron independientemente simplificaciones de las ecuaciones propuestas por Kirham y Bartholomew (1954, 1955) que permiten la determinación experimental de las tasas de mineralización bruta utilizando la siguiente ecuación:

$$A^*_t = A^*_o / (1 + (\theta t/A_o)^{m/\theta})$$

donde: A^*_t = abundancia de ^{15}N en exceso en el “pool” amonio en el tiempo t; A^*_o = abundancia de ^{15}N en exceso en el “pool” amonio en el tiempo 0; t = tiempo en días; A = tamaño del “pool” amonio; $\theta = (A_t - A_o)/t$ y m = tasa de mineralización

Esta ecuación se basa en los siguientes supuestos (Barraclough, 1995):

1. Cinética de orden cero, significando que durante toda la experiencia los procesos deben ocurrir a tasa constante.
2. El N mineralizado posee abundancia natural de ^{15}N (0,3663%). Esta suposición es más restrictiva porque implica que el ^{15}N inmovilizado por la biomasa microbiana no debe ser remineralizado durante la experiencia.
3. El marcador ($^{15}\text{NH}_4^+$) debe ser mezclado uniformemente con el NH_4^+ nativo del suelo.

Para estimar la tasa de nitrificación bruta se debe marcar el *pool* nitrato, es decir que siempre se marca el *pool* producto del proceso en estudio, eliminándose así la posibilidad de sobrestimar el proceso estimulación por sustrato.

La primera condición (1) no es muy restrictiva ya que en las condiciones habituales de trabajo (entre 2 y 7 días) la mayoría de los procesos son adecuadamente representados por esta cinética (Barraclough, 1995). La segunda condición (2) es satisfecha con los valores de enriquecimiento habitualmente utilizados (mayores a 10% en átomos de ^{15}N) que hacen despreciables las diferencias originadas por el

fraccionamiento isotópico. La condición de distribución homogénea del marcador debe ser atendida cuidadosamente, ya que grandes diferencias en tamaño y enriquecimiento del *pool* amonio pueden ocasionar errores en las determinaciones de las tasas de mineralización bruta (TMB) (Monhagan, 1995). Es recomendable la utilización de un inyector múltiple para distribuir el marcador de manera lo más homogénea posible y realizar las inyecciones aplicando la solución a medida que el inyector es extraído del suelo. En el caso de suelos con alto contenido de arena, donde la difusión de la solución marcadora es lenta y la adición de grandes volúmenes podría alterar mucho el nivel de humedad del suelo, es aconsejable la utilización de inyectores de gas $^{15}\text{NH}_3$ (Murphy et al., 1999).

La condición más restrictiva se refiere a la no ocurrencia de remineralización del N inmovilizado durante las determinaciones. Cuando se comienza a trabajar con un suelo nuevo es recomendable que sean probadas esas condiciones, realizando experimentos de dilución de *pool* en varios intervalos de tiempo. La disminución de las TMB con el tiempo significa que está ocurriendo remineralización, ya que está ingresando en el *pool* ^{15}N -amonio, siendo aconsejable trabajar solamente en el período que las TMB sean constantes.

Según Barraclough (1995), para suelos templados a 15°C o más, siete días sería un intervalo máximo razonable, mientras que para suelos tropicales con temperaturas hasta de 23°C , 3 a 5 días serían adecuados. Para suelos argiudoles del SE de la provincia de Buenos Aires, Videla et al. (2001) observaron que las tasas de mineralización se mantienen constantes entre 3 y 4 días, mientras que para suelos tropicales de Brasil este período varía entre 1 y 4 días según el contenido de MO (Videla et al., 2003), destacándose la importancia de la realización de experimentos previos para definir el tiempo adecuado antes de comenzar los ensayos de mineralización.

Algunos resultados obtenidos mediante la aplicación de la técnica de dilución del ^{15}N

Esta técnica ha sido usada para cuantificar las tasas de transformaciones brutas de N en suelos bajo diferentes condiciones ambientales y de manejo, ayudando en la elucidación de algunas etapas del ciclo del N que permanecían como “cajas negras”. A continuación, serán mencionadas algunas de las aplicaciones más relevantes de la técnica.

Para conocer el aporte de residuos de plantas en el proceso de mineralización del N, Hood & Wood (1996) estudiaron la mineralización bruta desde hojas y raíces de *Alnus glutinosa*, encontrando que el N de las raíces representa menos de 3% de la mineralización total. Watkins & Barraclough (1996) trabajaron con residuos de trigo y colza y observaron que 24% del N de la colza fue mineralizado en 12 días, en tanto que sólo 12% del trigo fue mineralizado en ese período.

Pilbeam & Warren (1995) utilizaron esta técnica para comprender por qué cultivos de maíz creciendo en suelos tropicales con bajos tenores de N en la región de Kenya no respondían a la fertilización con N. Ellos comprobaron que para estos suelos existe una correspondencia muy estrecha entre la mineralización bruta y el contenido de humedad del suelo, y de estos contenidos a su vez con la distribución anual de las precipitaciones.

Barraclough (1997) estudió la mineralización de aminoácidos (leucina y glicina). Hasta hace pocos años, se consideraba que la única vía posible para la liberación de N durante la descomposición de substratos complejos era posible a través del ataque de enzimas exocelulares con producción de amonio, y que los microorganismos solo podían absorber N-amonio de esa fracción. Por otra parte, existía la posibilidad que esas enzimas degradasen el substrato complejo hasta aminoácidos simples y que los microorganismos absorbiesen esas moléculas de aminoácidos, ocurriendo la deaminación en el interior de la célula, con liberación del exceso de amonio. En este trabajo se confirmó que los microorganismos pueden utilizar alternativamente amonio o aminoácidos, hecho o que no estaba establecido hasta entonces, aunque resta investigar en qué circunstancias se utiliza una u otra vía, si ellas co-existen y de qué depende la ocurrencia de cada una.

Landi et al. (1999) utilizaron un inhibidor de la glutamino-sintetasa para bloquear la inmovilización del N y determinar las tasas brutas de mineralización a partir de las tasas netas. El inhibidor no fue completamente efectivo, siendo mineralizado, y los microorganismos del suelo utilizaron NO_3^- , inmovilizándolo. O'Dowd et al. (1999) evaluaron la mineralización de suelos con D y L-leucina, demostrando que el suelo tendría el doble de microorganismos que asimilan L que D-leucina. Estos últimos serían más lentos para reaccionar y explicarían el período largo que ocurre en el crecimiento o en la respuesta fisiológica, cuando se agrega un residuo.

Stark & Hart (1997) estudiaron la nitrificación bruta en ecosistemas no perturbados de coníferas. En esos suelos la nitrificación no es considerada un proceso importante del ciclo del N debido a que no se acumula NO_3^- y las determinaciones de las tasas de nitrificación neta presentan valores muy bajos. Se comprobó que la nitrificación es un proceso activo, pero que el consumo de nitrato por los microorganismos es también muy activo, por lo que el nitrato no se acumula en estos sistemas, siendo su tiempo de residencia muy corto, lo que explica las bajas tasas de mineralización neta.

Son pocos los trabajos orientados a analizar el efecto del manejo del suelo en las TMB.

Gava (2003) estudió las tasas de mineralización y consumo de amonio a campo en un cultivo de maíz bajo labranza convencional (LC) y siembra directa (SD). No encontró efecto significativo del manejo en las variables estudiadas; posiblemente el período de implantación de la SD haya sido demasiado corto para que se manifestase su efecto. También, la gran variabilidad entre las repeticiones puede haber ocultado posibles diferencias. En los dos años estudiados es destacable una caída en los procesos brutos al final del ciclo del maíz, en respuesta a las bajas temperaturas y humedad de suelo. Las tasas de consumo de amonio fueron siempre mayores que las de mineralización, probablemente debido a un pequeño estímulo de los procesos que consumen NH_4^+ cuando se inyectó la solución de ^{15}N -amonio o a las características de alta demanda de N en ese agroecosistema.

Para suelos de la provincia de Buenos Aires bajo manejo de LC, SD y pastura (P) se encontró que después de cinco años de implantada, P produjo un aumento en las TMB con respecto a los manejos agrícolas, mientras que el mismo período bajo SD no mejoró dichas tasas respecto a LC. Por otro lado, las tasas de consumo de amonio no presentaron diferencias en respuesta al manejo y ni P ni SD mejoraron las tasas de nitrificación bruta respecto a LC (Videla et al., 2005).

Se han publicado pocos trabajos relacionando las tasas de mineralización bruta con las diferentes fracciones de la MO. Monaghan & Barraclough (1995), utilizando la técnica de marcación cruzada o espejo, analizaron la contribución de la materia macroorgánica del suelo en las tasas de mineralización bruta y se encontró que ella contribuye entre 4,5% a 12% en la mineralización total, dependiendo del tipo de suelo que la originó. Esta materia macroorgánica puede actuar como fuente o como destino del N mineralizado desde el resto del suelo, principalmente en las primeras etapas desde la incorporación.

Puri & Ashman (1998) cuantificaron el N de la biomasa microbiana (NBM) y las tasas de mineralización bruta (TMB) en un suelo de bosque a campo y no encontraron correlación entre ellas. La TMB presentó valores variables a través del año, mientras que la biomasa microbiana (BM) no tuvo cambios. Intentaron medir el aporte de la BM a la mineralización, no consiguiendo marcar uniformemente la biomasa microbiana.

Compton & Boone (2002) cuantificaron las tasas de mineralización y nitrificación bruta en muestras de suelo de bosque con diferentes historias de manejo previo (pastura, agricultura o bosque). Después de la extracción del N mineral para calcular la TMB y la tasa de nitrificación (TNB), el suelo fue fraccionado densimétricamente en fracción liviana y pesada. La fracción liviana contenía mayor cantidad de N que la fracción pesada, actuando la primera como un destino del N agregado.

Cookson & Murphy (2004) analizaron las TMB y TNB en suelos con o sin la fracción lábil disuelta de la materia orgánica (MOD). La eliminación de la MOD por lavado produjo una disminución de las TMB, TNB, del N potencialmente mineralizable y del N de la biomasa microbiana, mientras que la respiración no fue afectada. Esto significa que la remoción de la MOD no afectó el ciclo microbiano del C. A pesar que la MOD es una pequeña fracción de la MO del suelo, ella realiza una importante contribución al suministro de N en los suelos agrícolas.

Ciertamente es preciso continuar trabajando en investigaciones que busquen la comprensión de las relaciones entre el manejo del suelo en sistemas agrícolas y los procesos brutos del ciclo del N. También es importante estudiar los sitios o fracciones de donde proviene la MO que se mineraliza y tiene influencia en el crecimiento de los cultivos, no solo desde el punto de vista productivo sino también de la sustentabilidad de los sistemas.

BIBLIOGRAFIA

- Accoe, F., P. Boeckx, J. Busschaert, G. Hofman, y O. Van Cleemput. 2004. Gross transformations rates and net mineralisation rates related to the C and N contents of soil organic matter fractions in grasslands soils of different age. *Soil Biol. & Biochem.* 36:2075-2087.
- Barraclough, D. 1991. The use of mean pool abundances to interpret ^{15}N tracer experiments. I. Theory. *Plant & Soil* 131:89-96.
- Barraclough, D., E.L. Geens, G.P. Davies, y J.M. Maggs. 1985. Fate of fertilizer nitrogen. 3. The use of single and double labeled N-15 ammonium-nitrate to study nitrogen uptake by ryegrass. *J. Soil Sci.* 36:593-603.
- Barraclough, D. y G. Puri. 1995. The use of ^{15}N pool dilution and enrichment to separate the heterotrophic and autotrophic pathways of nitrification. *Soil Biol. & Biochem.* 27:17-22.
- Barraclough, D. 1997. The direct or MIT route for nitrogen immobilization: A ^{15}N mirror image study with leucine and glycine. *Soil Biol. Biochem.* 29:101-108.
- Barraclough, D. 1995. ^{15}N isotope dilution techniques to study soil nitrogen transformations and plant uptake. *Fertilizer Research* 42:185-192.
- Compton, J.E. y R.D. Boone. 2002. Soil nitrogen transformations and the role of light fraction organic matter in forest soils. *Soil Biol. & Biochem.* 34:933-943.
- Cookson, W.R. y D.V. Murphy. 2004. Quantifying the contribution of dissolved organic matter to soil nitrogen cycling using ^{15}N isotopic pool dilution. *Soil Biol. & Biochem.* 36:2097-2100.
- Davidson, E.A., S.C. Hart, C.A. Shanks, y M.K. Firestone. 1991. Measuring gross mineralization, immobilization, and nitrification by ^{15}N isotopic pool dilution in intact soil cores. *J. Soil Sci.* 42: 335-349.
- Gava, G.J.C. 2003. Compartimentalização do nitrogênio no sistema solo-planta na implantação da sementeira direta no ciclo da cultura do milho. Piracicaba. 125p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Hart, S.C., J.M. Stara, E.A. Davidson, y M.K. Firestone. 1994. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series, nº 5. Pp 985-1018.

- Hatch, D.J., S.C. Jarvis, y L. Phillips. 1990. Field measurement of nitrogen mineralization using soil incubation and acetylene inhibition of nitrification. *Plant & Soil* 124:97-107.
- Hood, R.C. y M. Wood. 1996. Estimating gross mineralization of *Alnus glutinosa* residues, using ^{15}N mirror image experimentation. In: Van Cleemput O, Hofman G & Vermoesen A. (Eds.) *Progress in nitrogen cycling studies*. Belgium, University of Ghent. Pp. 53-56.
- Kirkham, D. y W.V. Bartholomew. 1954. Equations for following nutrient transformation in soil, utilizing tracer data. *Soil Sci. Soc. of Am. Proc.* 18:33-34.
- Landi, L., D. Barraclough, L. Badalucco, A. Gelsomino, y P. Nannipieri. 1999. L-ethioninesulphoximine affects N mineralisation-immobilisation in soil. *Soil Biol. & Biochem.* 31:253-259.
- Monaghan, R. 1995. Errors in estimates of gross rates of nitrogen mineralization due to non-uniform distributions ^{15}N label. *Soil Biol. & Biochem.* 27: 855-859.
- Monaghan, R. y D. Barraclough. 1995. Contributions to gross N mineralization from ^{15}N labelled soil macroorganic matter fractions during laboratory incubation. *Soil Biol. Biochem.* 27:1623-1628.
- Murphy, D.V., A. Bhogal, M. Shepherd, K.W.T. Goulding, y S.C. Jarvis et al. 1999. Comparison of ^{15}N labelling methods to measure gross nitrogen mineralization. *Soil Biol. Biochem.* 31:2015-2024.
- Myrold, D. 2004. Tracer basics. Applications to N cycle.
http://cropandsoil.oregonstate.edu/classes/css523/w04/15N_tracer_files/frame.htm. (2004).
- Nishio, T., T. Kanamori, y T. Fujimoto. 1985. Nitrogen transformations in an anerobic soil as determined by $^{15}\text{NH}_4$ dilution technique. *Soil Biol. & Biochem.* 17:149-154.
- O'Dowd, R.D., D. Barraclough, y D.W. Hopkins. 1999. Nitrogen and carbon mineralization in soil amended with D- and L-leucine. *Soil Biol. & Biochem.* 31:1573-1578.
- Pilbeam, C.J. y G.P. Warren. 1995. Use of ^{15}N for fertilizer N recovery and N mineralization studies in semiarid Kenya. *Fertilizer Res.* 42:123-128.
- Puri, G. y M.R. Ashman. 1998. Relationship between soil microbial biomass and gross N mineralization. *Soil Biol. & Biochem.* 30:251-256.
- Schimel, D.S. 1986. Carbon and nitrogen turnover in adjacent grassland and cropland ecosystems. *Biogeochemistry* 2:345-357.
- Stark, J.M. y S.C. Hart. 1997. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forest. *Nature* 385:61-64.
- Stenger, R., E. Priesack, y F. Beese. 1995. Rates of net nitrogen mineralization in disturbed and undisturbed soils. *Plant & Soil* 171:323-332.
- Videla, C., P.C.O. Trivelin, G.A. Studdert, J.A. Bendasolli, y H.E. Echeverría. 2001. Tempo de incubação em experimentos de mineralização bruta em solos Argiudoles típicos da Argentina. VII Encontro Científico dos posgraduandos no CENA-USP, Piracicaba. Resumos em CD.



- Videla, C. y P.C.O. Trivelin. 2003. Tempo de incubação em experimentos de mineralização bruta do nitrogênio em solos de diferente conteúdo de matéria orgânica. IX° Encontro Científico dos Pós-Graduandos no CENA-USP, 2003, Piracicaba. Resumos em CD.
- Videla, C., A. Pazos, P.C.O. Trivelin, H.E. Echeverría, y G.A. Studdert. 2005. Mineralización bruta de nitrógeno bajo labranza convencional, siembra directa y pastura. *Ciencia del Suelo* 24(2):1-12.
- Watkins, N. y D. Barraclough. 1996. Gross rates of N mineralization associated with the decomposition of plant residues. *Soil Biol. & Biochem.* 28:169-175.