

APLICACION DE TECNICAS DE ^{13}C EN ESTUDIOS DE DINAMICA DE LA MATERIA ORGANICA DEL SUELO

Cecilia del Carmen Videla¹

La materia orgánica (MO) del suelo ha sido considerada desde los inicios de los estudios sistemáticos del suelo, un componente de fundamental importancia para el desarrollo de las plantas. Ella es clave en los procesos de formación del suelo: meteorización, formación del perfil, formación de la estructura, así como también en el desarrollo de la fertilidad del suelo, ya que a través de la mineralización de la MO los nutrientes quedan disponibles para las plantas. En las últimas décadas, se está enfatizando también el papel de la materia orgánica del suelo como fuente de CO_2 cuando es oxidada al convertir bosques y pasturas naturales en áreas cultivadas (Flach et al., 1997) y como secuestradora de las crecientes cantidades de CO_2 generado por las actividades humanas (Balesdent et al., 2000), de manera tal que la MO puede actuar tanto como fuente como destino del CO_2 , por lo cual hay necesidad de conocer mejor tiempos de residencia del C en los suelos.

El contenido de MO de un suelo es el resultado de un balance entre el aporte de residuos orgánicos, principalmente vegetales, y su descomposición. Tanto el aporte (crecimiento vegetal), como la descomposición de los residuos (actividad microbiana) son procesos condicionados por variables ambientales y son modificados por la interacción con la fracción mineral del suelo.

En la composición de la MO interviene en gran proporción el carbono (C), por lo cual los estudios de la MO del suelo están íntimamente ligados a la dinámica del C en el suelo. La dinámica de la MOS se ha investigado con métodos no isotópicos, también a través de la marcación usando materiales enriquecidos con ^{14}C , ^{13}C y ^{15}N y, además, a través del datado radiocarbónico. En los últimos años, el empleo del isótopo estable ^{13}C se ha constituido en una herramienta muy importante para ayudarnos a comprender y a seguir la dinámica de la MOS.

La mayoría de los estudios isotópicos sobre el origen y dinámica de la MOS se basan en la abundancia natural del isótopo estable ^{13}C . El carbono posee dos isótopos estables: el ^{12}C que es el más liviano y representa el 98,89% con respecto al total de C en la naturaleza, y el ^{13}C que representa el 1,11% del total. Si bien estos átomos se comportan químicamente de la misma manera, porque lo que define a un elemento es el número de protones del núcleo (6 para el C); la diferencia en su masa (dada por el número de neutrones del núcleo: 6 para el ^{12}C y 7 para el ^{13}C), provoca ligeras diferencias en el comportamiento físico-químico. Estas diferencias conducen a un fraccionamiento isotópico debido a la discriminación entre los dos isótopos. Como consecuencia de la discriminación isotópica ocurre una variación muy pequeña, en el orden de milésimos, en la proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Para expresar la relación de los isótopos del C de un material no puede utilizarse directamente la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ya que ella es afectada por diversos factores dependiendo de dónde la muestra es extraída, en qué ambiente esta muestra se ha desarrollado, entre otros. Es por esto que los análisis de la composición isotópica de C se realizan midiendo con un espectrómetro de masas, la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de las muestras en relación a un patrón internacional y el resultado se expresa en términos de la diferencia en la abundancia natural de ^{13}C de la muestra en relación al patrón.

El $\delta^{13}\text{C}$ es una expresión de la abundancia natural de un isótopo relativa a un material de referencia de laboratorio calibrado contra un patrón internacional; se expresa en unidades por mil (‰) y se calcula a través de la siguiente ecuación:

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP.C.C. 276, 7620 Balcarce, Argentina.
Correo electrónico: cvidela@balcarce.inta.gov.ar

$$\delta^{13}\text{C}\text{‰} = 1000 (R_{\text{muestra}} - R_{\text{estándar}}) / R_{\text{estándar}}$$

donde: R_{muestra} es la relación del isótopo pesado (^{13}C) al liviano (^{12}C) medido en la muestra y $R_{\text{estándar}}$ es la relación equivalente para el estándar. En el caso del C, el estándar es el carbonato fósil *Bellemnitella americana* de la formación Peedee de Carolina del sur, USA (abreviado PDB) (Boutton, 1996).

Durante el proceso de fotosíntesis, ocurre una discriminación isotópica al CO_2 , debida a las propiedades bioquímicas de las enzimas que fijan el C y al proceso de difusión que controla la entrada de CO_2 a las hojas. Esta discriminación es variable entre las plantas terrestres, las que se agrupan en 3 tipos de ciclos fotosintéticos (C3, C4 o CAM). Esta diferencia es mucho mayor que los pequeños cambios que ocurren durante la descomposición de la MO en el suelo, por lo que el C orgánico del suelo retiene la marcación de la vegetación que le dio origen, permitiendo conocer y datar cambios en la vegetación (Balesdent y Mariotti, 1996).

Las tres vías fotosintéticas principales conocidas son el ciclo de Calvin-Benson o C3, el ciclo de Hatch - Slack o C4 y el ciclo CAM (Crassulacean acid metabolism). La vía C3 opera en aproximadamente el 85 % de las plantas y domina los ecosistemas terrestres. Las plantas de ciclo C3 fijan el CO_2 atmosférico a través de la enzima RUBISCO (Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa), mientras que las C4 cuentan con un proceso enzimático adicional de fijación de CO_2 mediado por la enzima PEP carboxilasa (fosfoenolpiruvato carboxilasa). La PEP carboxilasa presenta alta afinidad (bajo K_m) por el CO_2 , mientras que la RUBISCO presenta una menor afinidad por el CO_2 y por eso esta última discrimina mucho más el isótopo pesado de carbono, ^{13}C , en relación al isótopo liviano, ^{12}C , que la PEP carboxilasa, y de esta forma las plantas de ciclo C3 acumulan menos ^{13}C .

La mayoría de plantas C3 tienen valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -24 a -30 ‰, con un valor promedio de -27‰. La PEP carboxilasa discrimina menos que la rubisco, de tal manera que, en plantas C4, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se sitúan entre -10 y -16 ‰, con un valor promedio de -13‰. Finalmente, la fotosíntesis CAM domina en los ecosistemas desérticos, con plantas tales como los cactus y que tienen la capacidad de cambiar de una fotosíntesis C3 durante el día a otra C4 durante la noche. El fraccionamiento isotópico es intermedio entre las plantas C3 y las C4.

¿Qué información puede obtenerse del $\delta^{13}\text{C}$ de un determinado material?

Como se mencionó anteriormente, la MO del suelo se forma a partir de la biomasa vegetal y conserva la marcación isotópica de la vegetación que le dio origen. Diversos estudios han utilizado la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la materia orgánica del suelo para establecer en qué medida ésta fue sintetizada a partir de biomasa C3 o C4, por ejemplo en rotaciones o cambios de vegetación natural a cultivada que incluyan plantas C3 y C4. El primer trabajo utilizando la abundancia natural de ^{13}C en la evaluación de las contribuciones individuales de plantas C3 y C4 en el COS fue el de Cerri *et al.* (1985). En este trabajo, fue examinada la pérdida de C derivado de la selva nativa de una zona del estado de San Pablo (Brasil) después de 12 y 50 años bajo el cultivo de caña de azúcar. En la cronosecuencia estudiada, la reserva de C del suelo (0-70 cm) bajo selva fue 126 Mg ha^{-1} , muy superior a lo observado bajo las plantaciones de caña de azúcar (de 78 y 92 Mg C ha^{-1} , para cañaverales de 12 y 50 años, respectivamente). En muestras de 0-20 cm de profundidad, el $\delta^{13}\text{C}$ de la MO de la selva nativa fue de -27‰, mientras que después de 12 y 50 años de caña de azúcar, aumentó a -24 y -19‰, respectivamente. Hasta la profundidad de 30 cm, la abundancia de ^{13}C del C total del suelo bajo la selva fue constante y de aproximadamente -25 ‰. Por debajo de 40 cm de profundidad, se encontró un aumento significativo llegando a -18 ‰ a los 70 cm de profundidad, lo que indicaría que en épocas anteriores la vegetación natural del área poseía una proporción bastante significativa de plantas de ciclo fotosintético C4.

Balesdent & Mariotti (1987), demostraron que después de 23 años de cultivo con incorporación de residuos de maíz al suelo, solo el 19% del COS en las fracciones de 0-50 μm provenía del maíz, y que cuando estos residuos fueron dejados en superficie, la incorporación del C derivado del maíz en el COS fue menor, en torno al 13%.

Con las informaciones de la composición isotópica inicial del suelo bajo vegetación nativa (C3) y después bajo una gramínea C4 (Brachiaria) se calculó, a través de un modelo simple, la cantidad de C del suelo derivado de las dos fuentes vegetales, utilizando la siguiente ecuación (Balesdent et al., 1988 y Vitorello et al., 1989):

$$\% \text{COS}_f = \left[\frac{(\delta^{13}\text{C}_B - \delta^{13}\text{C}_A)}{(\delta^{13}\text{C}_F - \delta^{13}\text{C}_A)} \right] \times 100$$

$$\% \text{COS}_A = 100 - \% \text{COS}_f$$

Donde, $\% \text{COS}_f$ es la proporción de C orgánico del suelo derivado de la vegetación nativa (C₃), que posee una marcación natural $\delta^{13}\text{C}_F$; $\delta^{13}\text{C}_A$ corresponde a la marcación natural de la vegetación C₄; $\delta^{13}\text{C}_B$ representa la marcación natural de C del suelo bajo la nueva vegetación.

También se ha documentado el efecto de los animales en pastoreo sobre la distribución de especies C3 y C4 a través del conocimiento de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en los pastizales de América del Norte (Archer, 1995). En estos ecosistemas, el predominio de especies C4 (*Schizachyrium scoparium-Sorghastrum nutans*) fue desplazado por la presión del pastoreo de ganado vacuno durante 18 años, apareciendo como dominantes algunos arbustos y gramíneas C3. Este cambio se reflejó en la composición isotópica de la biomasa aérea, raíces y MO del suelo. La vegetación en el área pastoreada mostró un $\delta^{13}\text{C}$ de -22,4‰, mientras que la de un área sin pastoreo tuvo un valor de -16,7‰, calculándose que la proporción de especies C4 disminuyó de 70 a 30% del total. La composición isotópica de la MO del área no pastoreada varió entre -17 y -14‰ en la parte superior e inferior del perfil, respectivamente, mientras que en el área pastoreada, los primeros cm tuvieron valores similares a la nueva vegetación (-21‰), indicando un rápido reciclaje del C orgánico.

Cuando se fracciona la MO del suelo, conocer los valores del $\delta^{13}\text{C}$ de fracciones de diferente labilidad, permite analizar la velocidad de ingreso de los residuos vegetales a la MO y su dinámica en el tiempo y en profundidad. Por ejemplo, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de fracciones separadas por tamaño de partículas en un área originalmente bajo savana dominada por gramíneas C4 y que por pastoreo se reemplazó por especies C3, reveló que la fracción de tamaño arena, también denominada materia orgánica particulada, consistió exclusivamente de carbono nuevo derivado de arbustos C3. Por otra parte, la fracción fina (tamaño arcilla y limo) fue más enriquecida en ^{13}C , indicando que fue originada por la vegetación original, con mayor abundancia de plantas C4 (Archer, 1995).

Otras posibles aplicaciones de los isótopos estables de carbono

- Una de las primeras aplicaciones de este método fue para determinar la vía, C3 o C4, de asimilación de CO₂ de especies en las que se desconocía. En situaciones en las que la separación manual es imposible, como muestras de raíces o broza, éste es el único método disponible (Svejcar & Boutton, 1985).
- El método ha demostrado ser útil no sólo en muestras vegetales, sino también para determinar la proporción C3/C4 en productos derivados. Así, por ejemplo, la contribución de especies C3 y C4 a la respiración en canopeos mixtos puede ser estimada a partir de mediciones de la

relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en el CO_2 liberado por las plantas en oscuridad (Still et al., 2003; Schnyder & Lattanzi, 2005).

- La composición C3/C4 de la dieta de herbívoros ha sido inferida a partir de mediciones de la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en tejidos animales. En herbívoros pequeños, como insectos, todo el animal puede ser analizado. En el caso de grandes mamíferos, la composición de la dieta se infiere a partir de análisis de diversos tejidos. Uno de los tejidos utilizado es el pelo, ya que una vez producido su composición isotópica permanece inalterada (Jones et al., 1981).
- También es posible estudiar cadenas tróficas e identificar fuentes primarias de C que rigen el flujo de energía en un ecosistema. En un estudio realizado en el ecosistema Pantanal, Mato Grosso do Sul (Brasil), se muestrearon productores primarios y consumidores: algas, plantas vasculares (emergentes, sumergidas y terrestres), invertebrados y peces detritívoros. Se encontró que mayoría de las plantas vasculares pertenece al grupo de las C3. A diferencia de lo esperado, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los consumidores primarios fueron mucho más empobrecidos que los valores de las algas de las que se alimentan, variando de -43 a -20‰. Esto se debería al uso de una fuente de carbono más negativa, posiblemente bacterias metanotróficas, lo que fue reforzado por los valores observados para los insectos bentónicos ($\delta^{13}\text{C}$ entre -62 a -49‰). Las evidencias encontradas en este estudio sugirieron que una combinación de fuentes foto y quimioautotróficas sustenta las cadenas alimentarias del Pantanal del río Paraguay (Fernandes Calheiros, 2003).
- En nutrición animal la técnica del trazador es útil en estudios de selectividad de pasturas por animales domésticos, por medio de medidas de $\delta^{13}\text{C}$ en las heces. Por ejemplo, se puede determinar la proporción de leguminosa (C3) y de una gramínea C4 en la dieta de bovinos.
- Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se utilizan también para detectar adulteración de alimentos como miel y bebidas (vino, cerveza, coñac, vinagre, etc.).
- La proporción entre plantas C4 y C3 en una región está determinada por la temperatura y humedad, de tal manera que el estudio de la composición isotópica permite estimar cuantitativamente los cambios paleoclimáticos. Por ejemplo, el $\delta^{13}\text{C}$ del colágeno del bisonte varía desde un -7‰ actual hasta un -19‰ hace 10.000 años. Este resultado parece estar relacionado con los cambios de la flora, de clima frío y húmedo, característica del Pleistoceno tardío, a condiciones más secas en el Holoceno.

BIBLIOGRAFIA

- Archer, S. 1995. Tree-grass dynamics in a Prosopis-thornscrub savanna parkland: reconstructing the past and predicting the future. *Ecoscience* 2: 83-99.
- Balesdent, J., D. Arrouays, y J. Gaillard. 2000. MORGANE: un modèle de simulation des réserves organiques des sols et de la dynamique du carbone des sols. *Agronomie* 20, pp. 3-10.
- Balesdent, J. y A. Mariotti. 1996. Measurement of soil organic matter turnover using ^{13}C natural abundance. Pp. 83-111. In: TW Boutton and SI Yamasaki (Eds). *Mass spectrometry of soils*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- Balesdent, J., A. Mariotti, y D. Boisgontier. 1990. Effect of tillage on soil organic carbon mineralization estimated from ^{13}C abundance in maize fields. *J. Soil Sci.* 41: 587-596.

- Boutton, T.W. 1996. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. Pp. 46-82. In: TW Boutton and SI Yamasaki (Eds). Mass spectrometry of soils. Marcel Dekker, Inc. New York, USA Balesdent, J & A Mariotti. 1987. Natural ^{13}C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 19: 25-30.
- Cerri, C., C. Feller, J. Balesdent, R. Victoria, y A. Plenecassegne. 1985. Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C , á rédute de la dynamique de la matière organique dans les sols. *C.R. Académie des Sciences, Paris*, Vol. 1, N 9 : 423-428.
- Fernandez Calheiros, D. 2003. Influência do pulso de inundação na composição isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) das fontes primárias de energia na planície de inundação do rio Paraguai (Pantanal, MS). Tese doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP. Brasil. 164 pp.
- Flach, K.W., T.O. Barnwell Jr, y P. Crosson. 1997: Impacts of agriculture on atmospheric carbon dioxide. In *Soil Organic Matter in Temperate Agroecosystems. Long-Term Experiments in North America*. E.A. Paul, E.T. Elliott, K. Paustian, and C.V. Cole (eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 3-13.
- Jones, R.J., M.M. Ludlow, J.H. Troughton, y C.G. Blunt. 1981. Changes in the natural carbon isotope ratios of the hair from steers fed diets of C4, C3 and C4 species in sequence. *Search* 12: 85-87.
- Svejcar, T.J. & T.W. Boutton. 1985. The use of stable carbon isotope analysis in rooting studies. *Oecologia* 67: 205-208.
- Still, C.J., J.A. Berry, M. Ribas-Carbo, y B.R. Helliker. 2003. The contribution of C3 and C4 plants to the carbon cycle of a tallgrass prairie: an isotopic approach. *Oecologia* 136: 347-359.
- Schnyder, H. y F.A. Lattanzi. 2005. Partitioning respiration of C3 - C4 mixed communities using the natural abundance ^{13}C approach – testing assumptions in a controlled environment. *Plant Biology* 7: 592-600.
- Vitorello, V.A., C. Cerri, F. Andreux, C. Feller, y R.L. Victória. 1989. Organic matter and natural carbon-13 distribution in forested and cultivated oxisols. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 53: 773-778.