

ACTIVIDAD NITROGENASA POTENCIAL Y CAPACIDAD REDOX EN UN ARGUIDOL

E B R PEROTTI, A PIDELLO

UN Rosario - CIUNR - FCV - Lab. Química Biológica I - Bd. O. Lagos y Ruta 33 - 2170 Casilda (Sta Fe), Argentina.

POTENTIAL NITROGENASE ACTIVITY AND REDOX CAPACITY IN AN ARGUIDOLL

Nitrogenase activity (NA) by soil heterotrophic microorganisms is expressed under highly demanding conditions of C-energy availability. In this study, NA was measured after increasing the redox capacity of the system through the application of saccharidic compounds as extra energy source. Season samples of an agricultural soil under continuous no-tillage during 8 years was used (organic-C, 1.48%; total-N%, 0.18%; pH, 5.6). After 20 hours of incubation, the redox capacity (expressed as O₂ consumption, based on CO₂ evolution) and NA (acetylene reduction) of soil supplemented with glucose, fructose or cellulose+glucose were measured. For the period of 1994-95, the spring soil samples exhibited lower redox capacity than winter soil samples (P<0.05) (when incubated with glucose, fructose and cellulose+glucose). The winter soil NA incubated with fructose and cellulose+glucose was lower NA (P<0.05). The quotient O₂/C₂H₄ was higher in winter soil (incubated with glucose, fructose and cellulose+glucose).

Key words: Arguidoll - Heterotrophic microorganisms - Nitrogenase activity - Redox capacity - Saccharids sources

INTRODUCCION

La transferencia de energía en los sistemas biológicos se realiza a través de mecanismos que involucran el intercambio de electrones (e⁻) (Pelmont 1993); conocerlos permite disponer de información para proteger y controlar las funciones biológicas en los agrosistemas, en especial aquellas que demandan elevada cantidad de energía (Lynch, Poole 1978, Hartmann, Zimmer 1994). La disponibilidad de C-energía en los suelos agrícolas es el principal factor que limita la expresión de las nitrogenasas de los microorganismos diazotrofos de vida libre (Silvester, Musgrave 1991, Perotti *et al.* 1995).

La expresión de las funciones microbianas que involucran transferencia de e⁻ se puede medir en relación con el factor capacidad redox del sistema (Kludze, Delaune 1995) y de esta manera, comprender mejor los mecanismos implicados en la expresión de la función. Estudios anteriores mostraron que suelos Arguidoles del sur de Santa Fe, bajo siembra directa, presentaban un mayor contenido de C-oxidable, producían mayor cantidad de CO₂ y la actividad nitrogenasa potencial era menor (Pidello *et al.* 1995). Este comportamiento condujo a postular la necesidad de estudiar más profundamente el impacto que ejerce el C-oxidable (factor capacidad redox) como reserva de e⁻. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la capacidad redox y la actividad nitrogenasa en muestras estacionales de un suelo bajo siembra directa, luego de la adición de distintos compuestos sacarídicos.

MATERIALES Y METODOS

El suelo, un Arguidol típico de Chabás (Sur de Santa Fe, Argentina) con una historia de cultivo bajo siembra directa de 8 años continuados y cultivo de soja de primera en los períodos 1993/94 y 1994/95; tenía las siguientes características (0-10 cm) carbono orgánico: 1,48%; nitrógeno 0,18%; pH en agua (1:1) 5,6. Se utilizaron muestras compuestas (0-10 cm) tomadas en las siguientes fechas: 23/6/94, 19/9/94, 08/02/95 y 10/5/95 (las que se denominaron invierno, primavera, verano y otoño respectivamente). Luego del muestreo fueron llevadas al laboratorio, secadas por aire forzado a temperatura ambiente, tamizadas (malla 1mm) y guardadas en freezer. La NA se midió por la técnica de reducción del acetileno y el factor capacidad redox del suelo se estimó a partir de la producción de CO₂. Se asumió que el proceso de oxidación de carbono orgánico tiene la reacción siguiente: C₆H₁₂O₆ + 6 O₂ > 6 CO₂ + 6 H₂O

Los moles de CO₂ se expresaron en µg de CO₂ y se convirtieron en µg de O₂ mediante el cálculo: Y = 0,727 x ; donde Y es g de O₂ g⁻¹ suelo y 0,727 la relación del peso molecular del O₂ y del CO₂; x es el CO₂ respirado en µg (Kludze, Delaune 1995).

En la experiencia 1 se adicionó al suelo una solución de glucosa o fructosa (2 mg C g⁻¹ suelo seco) en agua destilada estéril, en la experiencia 2 el suelo se suplementó con 16 mg C (celulosa-glucosa, 95:5) g⁻¹ suelo seco. Estas concentraciones se utilizaron por considerarlas no limitantes para la expresión de la NA, según resultados de ensayos previos. El sistema experimental consistió en colocar 0,5 g de suelo (equivalente seco) en tubos (22 ml) que fueron humectados con 1 ml de la solución de glucosa o fructosa en la experiencia 1, y 1 ml de agua destilada estéril en la experiencia 2. Los tubos fueron cerrados inmediatamente (tapa con orificio a rosca y septum de goma), se reemplazó el 10% de su atmósfera con C₂H₂, se agitaron por vortex y se incubaron durante 20 h a 30°C. Se asumió que durante ese periodo de tiempo no se alcanza a producir un empobrecimiento de O₂ que limite la producción de CO₂. La producción de los gases se

analizó en un cromatógrafo de fase gaseosa (KONIK Instruments, Barcelona, España), equipado con detector de ionización de llama y columna de Poropak N para el C_2H_4 (N_2 como gas carrier) y de conductividad térmica con columna de Poropak Q para medir el CO_2 . Todas las determinaciones se hicieron por cuadruplicado la diferencia entre los tratamientos se analizó por medio del test de análisis de la varianza y las medias aritméticas se separaron por el test múltiple de DSM.

RESULTADOS

En la experiencia 1 (Figura 1) la capacidad redox del suelo de primavera (325 y 340 g de O_2 g^{-1} en los tratamientos con glucosa y fructosa respectivamente) es menor al de invierno (428 y 413 μg de O_2 g^{-1} en los tratamientos con glucosa y fructosa respectivamente) ($P < 0,05$). Las muestras de suelo de otoño y de verano presentaron valores intermedios y no resultaron diferentes a las de invierno y primavera. En la experiencia 2, las muestras de suelo de cada estación tratado con celulosa+glucosa mostraron un comportamiento similar a la experiencia 1, con valores inferiores hasta 21% de O_2 consumido.

La NA (Figura 2) de las muestras estacionales tratadas con glucosa no difirieron estadísticamente ($P > 0,05$). El suelo de invierno tratado con fructosa presentó la NA menor ($P < 0,05$), el mismo resultado se obtuvo con las muestras suplementadas con celulosa+glucosa (95:5) (experiencia 2).

En la Figura 3 se observa la evolución del cociente O_2/C_2H_4 de las muestras estacionales. La adición de las tres fuentes sacarídicas produjo una evolución similar en las muestras de primavera, verano y otoño, mientras que las muestras de invierno produjeron un cociente mayor ($P < 0,05$).

DISCUSION

El factor capacidad redox es un índice de las oxidaciones del carbono que se producen durante la actividad respiratoria microbiana (Kludze, DeLaune 1995). La introducción de carbono reducido al sistema suelo permite cuantificar la potencialidad de las oxidaciones microbianas del carbono. Las diferencias en el consumo de O_2 (experiencias 1 y 2) se debería, a la proporción de la población en el estado de dormancia-actividad en las distintas estaciones, que depende de variaciones ambientales de origen climático y del estado fenológico de los cultivos (Nedwell, Gray 1987, Bossio, Scow 1995). La expresión de la función fijadora de nitrógeno de los microorganismos de vida libre en el suelo Argiudol que se estudia, requiere de importantes concentraciones glucídicas (Perotti *et al.* 1995).

En las experiencias descritas el suelo se suplementó con dos monosacáridos (glucosa y fructosa) que poseen

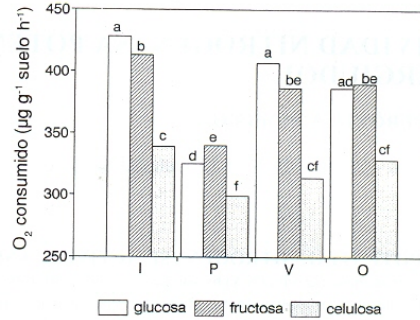


Figura 1. Capacidad redox (expresado como O_2 consumido) en las muestras de suelo de las experiencias 1 y 2. Las muestras (invierno, I; primavera, P; verano, V y otoño, O) fueron suplementadas con las distintas fuentes sacarídicas (n4). Letras iguales indican que no hay diferencias dentro de cada fuente sacarídica ($P > 0,05$).

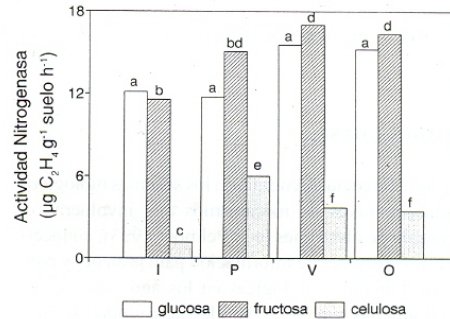


Figura 2. Actividad nitrogenasa en las muestras de suelo de las experiencias 1 y 2. Las muestras (invierno, I; primavera, P; verano, V y otoño, O) fueron suplementadas con las distintas fuentes sacarídicas (n4). Letras iguales indican que no hay diferencias dentro de cada fuente sacarídica ($P > 0,05$).

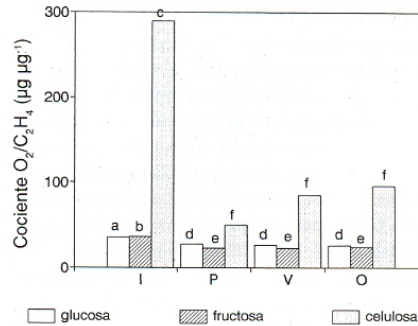


Figura 3. Cociente O_2/C_2H_4 en las muestras de suelo de las experiencias 1 y 2. Las muestras (invierno, I; primavera, P; verano, V y otoño, O) fueron suplementadas con las distintas fuentes sacarídicas. Letras iguales indican que no hay diferencias dentro de cada fuente sacarídica ($P > 0,05$).

igual poder reductor (Eroshin 1977) y aportarían al sistema la misma cantidad de equivalentes reductores. No obstante se observó una respuesta a la suplementación sacarídica diferente entre las muestras estacionales.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno poseen una selectividad en la utilización de las fuentes carbonadas en cultivos puros, por ejemplo hay especies del género *Azospirillum* que utiliza dentro de los sacaridos a la glucosa, otros la sacarosa o celulosa (Krieg, Dobreiner 1984). Esta diferencia nutricional podría explicar las diferencias en la expresión de la función fijadora de nitrógeno de las muestras estacionales a las fuentes empleadas.

El estudio de la relación que existe entre un proceso oxidativo, la respiración, y otro reductor como es la NA permite evaluar los flujos de e- que se producen en el sistema suelo. Estos intercambios de e- entre un proceso global como el consumo de O₂ por parte de la población total de microorganismos aerobios y la reducción del acetileno, producto de una porción pequeña de la población microbiana, permitiría analizar la estructura de la población y sus modificaciones (Anderson 1994).

La presencia de una importante cantidad de C-glucosídico genera un factor capacidad redox que estaría relacionado con la estructura de la población microbiana en un momento dado. La estructura se puede modificar por condiciones ambientales, prácticas de manejo e introducción de nuevas especies de vegetales. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la cantidad de e- derivados hacia la expresión fijadora de nitrógeno se redujo en las muestras de invierno. Este hecho sugiere que existieron modificaciones importantes en la estructura de la comunidad microbiana entre las muestras analizadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero del CIUNR y SeCYT-UNR.

REFERENCIAS

- Anderson TH. 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: Applications and limitations. Beyond the biomass. Ritz K, Dighton KE (Eds). John Wiley & Sons. Chichester, UK. pp 67-76
- Bossio DA, Scow KM. 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61:4043-50
- Eroshin VK. 1977. Material-energetic balance of micro-organism growth. *Process Biochem.* 12:29-31
- Hartmann A, Zimmer W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. Okon Y (Ed). *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press Inc, Florida: 16-39
- Kludze HK, DeLaune RD. 1995. Wetland response to redox intensity and capacity. *Soil Sci. Am. J.* 59:939-945
- Krieg NR, Dobreiner J. 1984. Genus *Azospirillum*. En: *Bergey's manual of systematic microbiology*. Krieg N, Holt JG (Eds). Williams & Wilkins, Baltimore: 94.
- Lynch JM, Poole NJ (Eds). 1978. *Microbial ecology: a conceptual approach*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 265 p.
- Nedwell DB, Gray TRG. 1987. Soil and sediments as matrices for microbial growth. *Symposia of Society for General Microbiology*. 41:21-54
- Pelmont J. 1993. *Bacteries et Environnement*. Presses Universitaires de Grenoble. Grenoble. 899 p.
- Perotti EBR, Chapo G, Pídello A. 1995. Actividad nitrogenasa en relación con el carbono disponible y el nitrógeno inorgánico en un Argiudol. *Ciencia del Suelo*. 13:11-15
- Pídello A, Perotti EBR, Chapo GF, Menéndez LT. 1995. Materia orgánica, actividad microbiana y potencial redox en dos suelos argiudoles típico bajo labranza convencional y siembra directa. *Ciencia del suelo*. 13 (1):6-10
- Silvester WB, Musgrave DR. 1991. Free-living diazotrophs. Dilworth MJ, Glenn AR (Eds) *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*. Elsevier. Amsterdam. pp 162-186