DETERMINACION COLORIMETRICA DE GOMAS MICROBIANAS DEL SUELO

Roberto Alvarez; Oscar J. Santanatoglia y Norberto R. Fernández (1)
Centro de Radiobiología y Cátedra de Manejo y Conservación de Suelos.
Fac. de Agronomía - UBA - Av. San Martín 4453 - (1417) Buenos Aires

RESUMEN

El contenido de gomas microbianas de distintos suelos fue determinado por el método gravimétrico tradicional y por una modificación colorimétrica de éste. En la misma, las gomas extraídas del suelo son atacadas por una mezcla de $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4. El Cr^{3+} que se genera por reducción del Cr^{6+} al oxidarse la materia orgánica es cuantificado colorimétricamente.

Se obtuvo una alta correlación ($r = 0{,}981^{+++}$) entre los valores hallados por las dos técnicas en los suelos utilizados, indicando ésto la posibilidad de sustituir la metodología tradicional por la vía colorimétrica.

Palabras clave: gomas microbianas - materia orgánica - determinación colorimétrica.

COLORIMETRIC DETERMINATION OF MICROBIAL GUMS IN SOIL

ABSTRACT

The microbial gum content of different soils was determined by the traditional gravimetric method and by a colorimetric modification of it. The extracted gums from soil were oxidized by a $K_2Cr_2O_7$-H_2SO_4 mixture. The Cr^{3+} formed by the reduction of Cr^{6+} during organic matter oxidation, was measured colorimetrically.

High correlation coefficientes ($r = 0{,}981^{+++}$) were observed between the results obtained by the two techniques in the soils used, indicating the possibility of sustitution of the conventional method by the colorimetric procedure.

Key words: microbial gum - organic matter - colorimetric determination.

(1) Becario CONICET.

INTRODUCCION

El ambiente físico, químico y biológico del suelo, en gran medida está determinado por la dinámica del agua, del CO_2 y del O_2. Esta dinámica depende en parte del estado de agregación del suelo y de su estabilidad, siendo a su vez estas propiedades determinadas por la presencia de coloides orgánicos, coloides inorgánicos, sesquioxidos y cationes polivalentes.

Existen trabajos enfocados a evaluar la importancia que tienen las gomas microbianas como agentes agregantes y su incidencia en la estabilidad de los agregados del suelo (Rennie et al., 1954; Harris et al., 1963 y 1964; Dommerges y Mangenot, 1970, Aspiras, 1971 y Griffiths y Burns, 1972). Recientemente se ha estudiado la relación entre el contenido de gomas, estabilidad estructural y distintos manejos, encontrándose una estrecha relación entre el primero y el nivel de degradación del suelo (Santanatoglia y Fernández, 1983).

Una de las razones por las cuales el estudio de las gomas no ha sido difundido en nuestro país es lo tedioso y costoso del método de extracción y medida de las mismas, ya que la determinación es gravimétrica y siendo la cantidad de gomas en el suelo muy pequeña, se necesita trabajar con volúmenes considerables del mismo. Debido a ésto se ha desarrollado una modificación de la metodología tradicional, en base a la disminución de la cantidad de suelo a tomar, haciéndose la determinación por colorimetría. Ello reduce el costo operativo y permite analizar un mayor número de muestra diarias.

MATERIALES Y METODOS

Suelos utilizados

Se analizaron 14 muestras correspondientes al horizonte A de distintos subgrupos de suelos cuyas características se detallan en la Tabla 1.

Métodos de extracción y análisis de gomas

Tradicional

El método utilizado fue el de Rennie et al (1954), que se basa en la dispersión de 100 g de suelo en medio alcalino, posterior floculación de ácidos húmicos en medio ácido y sobre el líquido sobrenadante la precipitación de gomas microbianas con acetona, determinándose éstas, previo secado, por gravimetría. El porcentaje de cenizas se determinó en todas las muestras por calcinación a 550°C durante 3 horas.

Método colorimétrico

Se sigue la misma técnica de extracción de gomas que en el caso anterior, utilizando menor cantidad de suelo y manteniendo la proporción de los reactivos. Las gomas obtenidas se digieren con una mezcla de $Cr_2O_7K_2$ y H_2SO_4, siendo el color verde generado por la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} proporcional al contenido de compuestos orgánicos de la muestra (Sims y Haby, 1971).

Extracción de gomas

Pesar 7,5 g de suelo seco al aire y tamizado por malla de 1 mm y pasarlo a un erlenmeyer de 125 ml. Agregar 30 ml de 0,5 N NaOH y agitar durante 3 horas. Ajustar el pH a 2,5 con HCL y centrifugar para precipitar los ácidos húmicos. El sobrenadante se filtra por papel de filtro común para eliminar los residuos vegetales que pudieran haber pasado el tamiz y agregar a 20 ml del filtrado 40 ml de acetona. Luego de 30 minutos centrifugar a 2.400 rpm durante 5 mi-

TABLA 1: Propiedades de los suelos utilizados.

Muestra	Subgrupo	% Materia orgánica	pH (1: 2,5)	Conductividad eléctrica (1)
1, 2 y 3	Argiudol Vértico	3,15 - 4,02	6,6 - 6,7	0,20
4 y 5	Argiudol Típico	3,54 - 3,82	6,2 - 8,2	0,26
6	Natracuol Típico	2,06	9,7	1,97
7, 8, 9 y 10	Hapludol Típico	3,16 - 5,37	5,9 - 6,4	0,16 - 0,27
11, 12 y 13	Hapludol Entico	1,38 - 1,55	5,9 - 6,1	0,11 - 0,18
14	Hapludalf Entico	0,14	6,5	0,12

Las muestras utilizadas corresponden a los primeros 15 cm del horizonte A.
(1) Determinada en extracto de saturación y expresadas en $dS \cdot m^{-1}$.

nutos y descartar el sobrenadante. Agregar a cada tubo una mezcla 1:1 de agua y acetona con el objeto de eliminar el NaCl que interfiere en la coloración y agitarlos a mano intensamente, luego de 10 minutos de reposo centrifugar nuevamente. Para eliminar la acetona se secan los tubos en estufa.

Desarrollo del color

Agregar en el mismo tubo 1 ml de 1 N $K_2Cr_2O_7$ y 2 ml de H_2SO_4 c., agitar y luego de 20 minutos incorporar 5 ml de H_2O , leyéndose la absorbancia a 600 nm.

Curva de calibración

Preparar una dilución de agar en agua que permita obtener una concentración de 1 mg/ml. Tubos conteniendo de 1 a 5 ml de la misma son secados en estufa, procediéndose a la coloración en la forma descripta.

TABLA 2: Contenido de gomas microbianas de los suelos (mg/g de suelo).

	Método gravimétrico			
Muestra	+ cenizas	% cenizas	– cenizas	Método colorimétrico
1	1,30	54	0,59	0,61
2	0,94	57	0,41	0,42
3	0,87	58	0,37	0,38
4	0,97	49	0,50	0,51
5	1,50	63	0,56	0,58
6	1,54	36	0,99	0,31
7	1,34	48	0,70	0,64
8	1,26	52	0,60	0,62
9	1,85	49	0,94	0,86
10	1,55	60	0,62	0,69
11	0,73	52	0,35	0,30
12	0,55	66	0,20	0,25
13	1,23	61	0,48	0,51
14	0,42	72	0,12	0,16

RESULTADOS Y DISCUSION

En base a los resultados obtenidos por Sims y Haby (1971) se pensó en determinar la cantidad de gomas microbianas del suelo por vía colorimétrica. Para ello, se realizó un ensayo preliminar con el objeto de evaluar el efecto de la mezcla oxidante utilizada por estos autores sobre distintas sustancias orgánicas de composición conocida (Fig. 1).

Los hidratos de carbono presentaron la misma relación entre concentración y absorbancia, lo mismo sucedió para las sustancias protéicas.

Sin embargo entre estos dos grupos existe una marcada diferencia, siendo la intensidad del color producido por los carbohidratos mayor que la producida por las sustancias proteicas, a igual cantidad de carbono agregada.

En consecuencia se decidió utilizar agar para la curva de calibración, por ser esta sustancia un carbohidrato de alto peso molecular como las gomas microbianas (Fig. 2).

El contenido de gomas expresado como mg/g de suelo osciló entre 0,42 y 1,85 para el método gravimétrico tradicional, mientras que descontando las cenizas el rango fue de 0,12 a 0,99. Valores semejantes han sido hallados por otros autores para suelos de características parecidas (Rennie et al., 1954 y Chester et al., 1957).

Una de las críticas más importantes a la técnica de Rennie et al., es que al determinar gravimétricamente el contenido de gomas se incluye no solamente a éstas sino también a sustancias inorgánicas (Greenland y Oades, 1975). Para salvar este inconveniente se determinó el contenido de cenizas de las muestras, variando éste entre 36 y 72 por ciento, siendo el promedio del 55 por ciento.

Las medias de los coeficientes de variación de las determinaciones fue del 10 por ciento para el método gravimétrico, tomándose en cuenta o no las cenizas y del 4 por ciento para el método colorimétrico.

El análisis de los resultados sugiere una estrecha relación entre los dos métodos para los suelos utilizados, excepto en el caso de la muestra 6. La misma pertenece a un suelo hidrohalomórfico, mientras que el resto corresponde a suelos zonales; por esta razón no se la consideró en el análisis de regresión.

La correlación entre el método gravimétrico y el colorimétrico fue de 0,974, aumentando a 0,981 al descontar el contenido de cenizas. Estos coeficientes de correlación explican el 95 y el 96 por ciento de la variación encontrada, siendo ambos significativos con una probabilidad del 99,9 por ciento (Figs. 3 y 4).

Puede observarse que el valor del coeficiente de regresión cuando se descuentan las cenizas es aproximadamente el doble que cuando se las incluye en el análisis, lo cual se debe a que el tenor de las mismas es alrededor del 50 por ciento y que el método colorimétrico determina solamente sustancias orgánicas, no siendo interferido por éstas.

De lo anterior se deduce que incluir o no las cenizas afecta en gran medida el valor absoluto del contenido de gomas microbianas pero no influye mayormente sobre la correlación entre las dos técnicas.

Mediante el método gravimétrico es posible analizar entre 4 y 12 muestras por día, según el equipamiento del laboratorio, en tanto que la vía colorimétrica permite realizar hasta 50 análisis diarios.

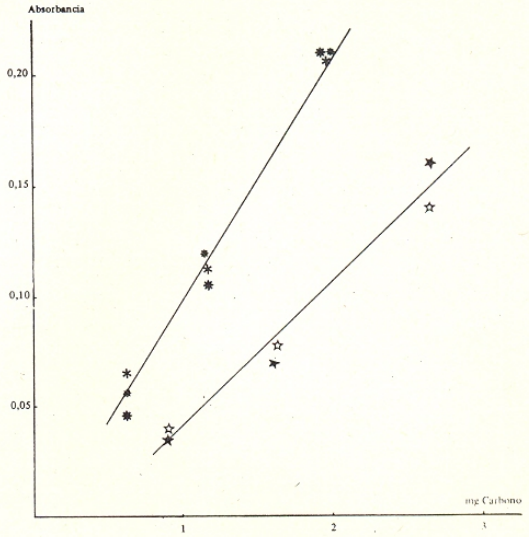

Fig. 1: Oxidación de sustancias carbonadas por acción del $K_2Cr_2O_7$.

Solución oxidante: 5 ml, N $K_2Cr_2O_7$ y 10 H_2SO_4.

Las sustancias orgánicas se agregaron en soluciones de 10 ml. ✸ Agar, ✱ Almidón, ✵ Inulina, ✦ Gelatina, ☆ Peptona.

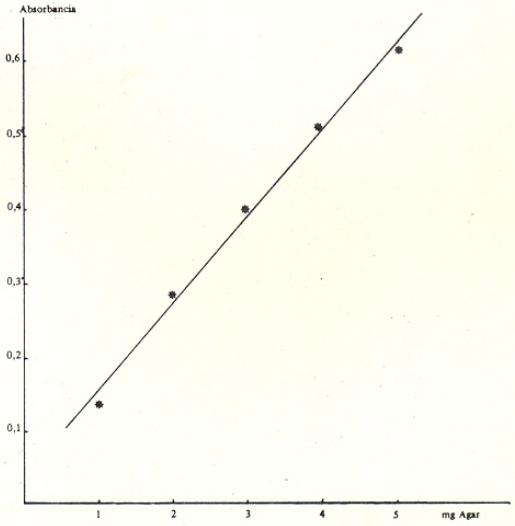

Fig. 2: Curva de calibración.

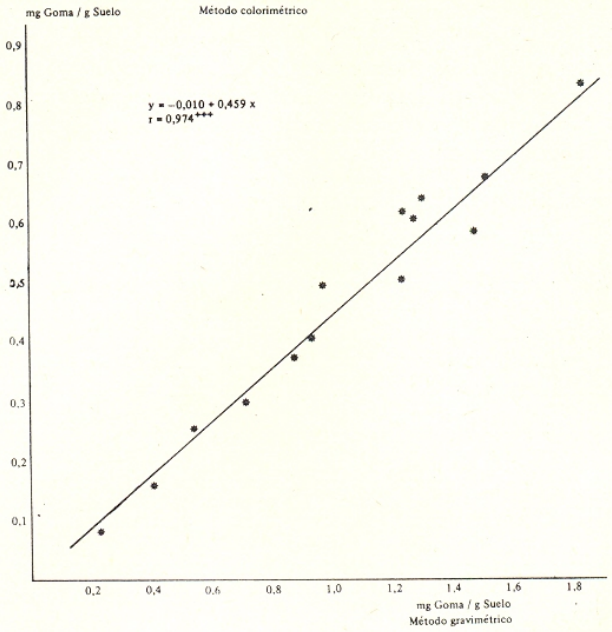

Fig. 3: Relación entre el método gravimétrico sin calcinación y el método colorimétrico.

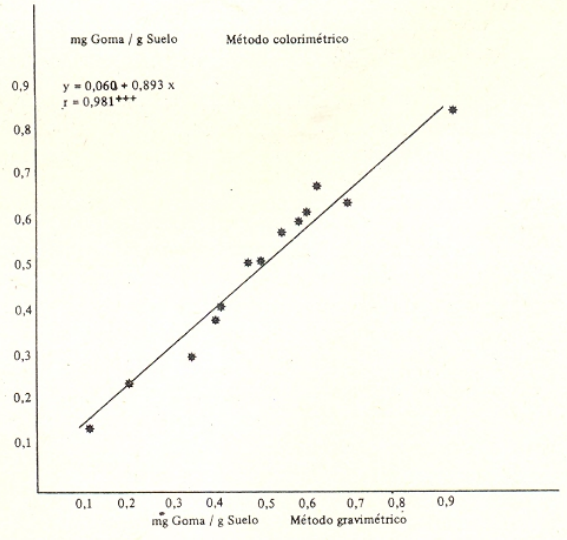

Fig. 4: Relación entre el método gravimétrico con calcinación y el método colorimétrico.

- La estrecha correlación entre los métodos probados se observó para suelos de características muy diferentes, excepto en un suelo hidrohalomórfico (Natracuol) donde los valores obtenidos por las dos metodologías no son comparables.
- El análisis por colorimetría permite incrementar el número de muestras a analizar por día hasta 50, con un consumo de reactivos mucho menor al método gravimétrico.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Laboratorio de la Cátedra de Manejo y Conservación de Suelos el habernos facilitado algunos datos analíticos de los suelos utilizados.

CONCLUSIONES

- Existe una alta correlación entre los valores de contenido de gomas microbianas de suelos analizados por el método gravimétrico y por la técnica colorimétrica propuesta.
- Es conveniente efectuar la curva de calibración de ésta con carbohidratos debido a la oxidación diferencial que produce la mezcla oxidante utilizada sobre las sustancias orgánicas según que éstas sean hidratos de carbono o compuestos proteicos.
- Al determinar el contenido de gomas microbianas por gravimetría éstas poseían en promedio un 55 por ciento de cenizas, siendo la mayor parte de ellas el NaCl producido al neutralizar con ClH el Na OH de la solución de extracción.

REFERENCIAS

Aspiras, R. B., 1971. Chemical and physical stability of microbially stabilized aggregates. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35: 283-285.

Chester, G.; O. J. Attoe and O. N. Allen, 1957. Soil aggregation in relation to various soil constituents. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 21: 272-277.

Dommergues, Y. et F. Mangenot, 1970. Ecologie microbienne du sol. Chapitre XIII. Role des micro-organisms dans la genese et degradation de la structure. Masson et Cie., Editeurs, Paris, pág. 354-374.

Greenland, D. J. and J. M. Oades, 1975. Soil components, Vol. 1, Organic components, Chapter 2, Saccharides. Gieseking, J. E., Editor; Springer-Verlas. New york. pág. 213-261.

Griffiths, E. y R. E. Burns, 1972. Interaction between phenolic substances and microbial polysaccharides in soil aggregation. Plant and Soil, 36: 599-612.

Harris, R. F.; O. N. Allen; G. Chester and O. J. Attoe, 1963. Evaluation of microbial activity in soil aggregates stabilization and degradation by the use of artificial aggregates. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 27: 542-545.

Harris, R. F.; O. N. Allen; G. Chester and O. J. Attoe, 1964. Mechanisms involved in soil aggregate stabilization by fungi and bacteria. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 28: 529-532.

Rennie, D. A.; E. Truog and O. N. Allen, 1954. Soil aggregation as influenced by microbial gums, level of fertility and kind of crop. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 18: 399-403.

Santanatoglia, O. J. y N. R. Fernández, 1983. Estabilidad estructural y contenido de gomas microbianas, bajo distintos tipos de manejo, en un suelo de la Serie Ramallo (Argiudol Vértico). Ciencia del Suelo 1: 143-149.

Sims, J. R. y V. A. Haby, 1971. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. Soil Sci., 112: 137-141.