

## NOTA TECNICA

# BIOENSAYO MICROBIANO PARA DETERMINAR LOS NUTRIMENTOS DISPONIBLES EN ABONOS ORGÁNICOS

*Philippe Vandevivere<sup>1</sup>, Carlos Ramírez<sup>2</sup>*

### RESUMEN

**Bioensayo microbiano para determinar los nutrientes disponibles en abonos orgánicos.** Se describe la metodología de un bioensayo, que utiliza el crecimiento de la población microbiana nativa del suelo en lugar de las plantas indicadoras (prueba de invernadero), para predecir el suministro de nutrientes disponibles en los abonos orgánicos. La ventaja del uso de microorganismos es su crecimiento rápido que permite obtener los resultados del ensayo en menos tiempo (2 días en lugar de 5 o 6 semanas). Al inicio se mezcla el abono orgánico en estudio, con el suelo en una proporción 1:9 (peso seco) y se ajusta la humedad a capacidad de campo. Para estimular el crecimiento microbiano en la mezcla se agrega glucosa como fuente de energía y C. Así el crecimiento microbiano estará limitado por la cantidad de nutrientes limitantes en la mezcla y no por carbono. A los 2 días se obtiene el pico del crecimiento de los microorganismos y se determina la biomasa microbiana. Además es posible calcular el contenido de nutrientes en la biomasa, gracias a las relaciones conocidas de C:N, C:P, C:K en ésta, que representan las cantidades inmobilizadas por los microorganismos. Estos nutrientes corresponden a aquellos biológicamente disponibles en las mezclas donde se ha encontrado una buena correlación entre el crecimiento microbiano y el de las plantas indicadoras (sorgo). La metodología permite comparar la calidad nutricional de los fertilizantes orgánicos y establecer su costo relativo y equivalencia de fertilizante químico.

### ABSTRACT

**Microbial bioassay to determine the available nutrients in organic fertilizers.** The methodology of a bioassay is described, in which the growth of a soil-borne native microbial population is used, instead of indicator plants (green-house test), to predict the nutrient availability of organic fertilizers. The fast growth of micro-organisms is used to an advantage because the results are obtained earlier (two days instead of 5-6 weeks). At first, the tested organic fertilizer is mixed with the soil at a ratio of 1:9 (dry weight!dry weight) and the humidity is then adjusted to field capacity. A mixture of glucose, as a source of energy, and C is added to stimulate the microbial growth. Thus, the microbial growth will be limited by the amount of limiting nutrients of the mixture and not by the carbon. At two days, the growth peak of micro-organisms is obtained and the microbial biomass is determined. More over, it is possible to compute the nutrient content of the biomass, due to the known relationships of C:N, C:P and C:K, which represent the amounts unmoved by the micro-organisms. These correspond to the nutrients biologically available in the mixtures, where a good correlation has been found among the microbial growth and the indicator plants (sorghum). The methodology allows to compare the nutritional quality of the organic fertilizers and to establish its relative cost and its chemical fertilizer equivalence.

<sup>1</sup> CIGRAS, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

<sup>2</sup> Estación Experimental Fabio Baudrit M. - CIPROC, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

**Palabras clave:** métodos, ensayo biológico, microorganismos, disponibilidad de nutrientes, abonos orgánicos.

**Key words:** methods, bioassays, microorganisms, nutrient availability, organic fertilizers.

---



## INTRODUCCION

La escasez de sitios para rellenos sanitarios así como el aumento constante de los residuos orgánicos municipales, ha estimulado los esfuerzos alrededor del mundo encaminados a reciclar los residuos orgánicos para la generación de energía, fertilizantes orgánicos (FO) y otros productos. La calidad de los FO es un aspecto de mucha relevancia para su comercialización a la luz de su alta variabilidad (Vandevivere y Ramírez 1995a). El análisis químico de los FO no es enteramente satisfactorio porque no reflejan necesariamente la disponibilidad actual de los nutrimentos para las plantas.

Por otro lado, los intentos para utilizar los análisis microbianos para evaluar la fertilidad del suelo han tenido éxito parcial. Mientras que la medida de la biomasa microbiana o la actividad en el suelo no ha correlacionado con la fertilidad (Brendecke *et al.* 1993; Clark 1965; Rusch 1972), las mismas determinaciones en muestras de suelo incubadas bajo varias condiciones han mostrado a menudo una correlación con la fertilidad del suelo (Waskman and Starkey 1924; Mehlich *et al.* 1933; Mehlich *et al.* 1934; Moors 1938; Rusch 1972). Este último autor realizó estudios en los que midió el crecimiento microbiano después de dos días de haber agregado carbohidratos como indicador del suministro de nutrimentos por suelos y FO. Sin embargo, este autor no aportó suficientes datos para fundamentar exhaustivamente sus conclusiones sobre la utilidad del análisis microbiano.

En el presente trabajo se describe una metodología modificada, basada en los principios de Rusch, para determinar satisfactoriamente el valor nutritivo de FO. El análisis detallado de la validez de las modificaciones así como de la utilidad de la prueba se hizo en un estudio previo (Vandevivere y Ramírez 1995b).

## MÉTODO

### Primer día:

- 1- Se escoge un suelo con pH superior a 5,5 y no muy arcilloso para evitar la fijación de nutrimentos. Se pasa por malla de 2 mm. Se almacena húmedo.
  - 2- Se determina la humedad del suelo y del abono (mg H<sub>2</sub>O/ mg suelo húmedo) y también la humedad a capacidad de campo del suelo (aprox. 0,3 bar) que es la humedad óptima para el bioensayo microbiano.
  - 3- Se mezclan bien, en un recipiente de plástico, el suelo húmedo (el equivalente de 270 g de suelo seco) con el abono orgánico húmedo (el equivalente de 30 g de abono seco).
  - 4- Se ajusta la humedad de la mezcla a capacidad de campo.
  - 5- Se repite con solo suelo (sin agregarle abono).
-

**Segundo día:**

- 1- Se divide la mezcla suelo + abono en dos partes de igual peso que se colocan en dos frascos erlenmeyer de 1L.
- 2- En uno de los frascos se agrega glucosa en polvo (10/0 del peso total) y 4,8 mg de cicloheximida (1 mL de una solución de 4,8 mg de cicloheximida por mL; esta solución se puede guardar refrigerada por varias semanas y se debe manejar con mucho cuidado pues esta sustancia es muy tóxica para humanos. Tampoco se puede tocar el suelo con la mano después de agregarle el cicloheximida).
- 3- Se mezcla muy bien.
- 4- Se hace lo mismo con la muestra de suelo sin abono.
- 5- Se dejan los frascos SIN TAPAR a temperatura ambiente y preferiblemente en la oscuridad.

En resumen los tratamientos serían: 1. mezcla suelo/abono con glucosa y cicloheximida, 2. mezcla suelo/abono sin glucosa ni cicloheximida, 3. suelo solo con glucosa y cicloheximida y 4. suelo solo sin glucosa ni cicloheximida.

**Cuarto día:**

Ahora basta con medir la biomasa microbiana en cada uno de los cuatro tratamientos. Se usa el método de 'Substrate-Induced-Respiration' modificado por Cheng y Coleman (1989):

- 1- Se divide cada una de las cuatro muestras en tres triplicados de igual peso que se colocan en frascos erlenmeyer (1 o 0,5L).
- 2- Se agrega 0,4 g de glucosa en cada frasco y se mezcla muy bien. Esta glucosa se utiliza para determinar la biomasa microbiana. La evolución de CO<sub>2</sub> por las muestras es proporcional a

la biomasa microbiana siempre y cuando el C de fácil utilización (glucosa) no sea limitante.

- 3- Después de media hora se conectan los 12 frascos, además de 3 frascos vacíos, al aparato de flujo de aire sin todavía conectar las trampas de NaOH con el fin de remover el CO<sub>2</sub> que se pudo haber acumulado en los frascos durante este período. Media hora de flujo de aire libre de CO<sub>2</sub> es suficiente. De esta manera se atraparán exclusivamente el CO<sub>2</sub> producido durante el período de incubación una vez que se hayan conectado las trampas de NaOH. Cabe recordar que el aire que llega a los frascos con las muestras y los controles no contiene CO<sub>2</sub>, pues el aire se hace burbujear antes por una trampa de NaOH ( $\text{CO}_2 + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ ).
- 4- Después de otra media hora, se conectan las trampas con 40 mL de NaOH (0,03 M) corriente abajo de los frascos con las muestras. Se arregla el burbujeo en las trampas hasta lograr un flujo de burbujas casi continuo y aproximadamente parejo entre los frascos). Esto asegura un flujo de alrededor de 2-3 L/hora, suficiente para evacuar el aire en el espacio arriba del suelo en los frascos erlenmeyer necesario para capturar el CO<sub>2</sub> que se produce durante el período de incubación cronometrado. El aire que abandona los frascos acarrea el CO<sub>2</sub> producido en las muestras y neutraliza parte del NaOH en las trampas para formar carbonato de sodio. Cada mol de CO<sub>2</sub> neutraliza 2 equivalentes de OH<sup>-</sup>.
- 5- Después de 1h, se interrumpe el flujo de aire y se transfiere cuantitativamente el contenido de las trampas en pequeños frascos erlenmeyer en donde se agregan 6 mL de BaCl<sub>2</sub> (0,2 N = 0,1 M) y dos gotas del indicador fenolftaleína que da a la solución alcalina un color púrpura. El BaCl<sub>2</sub> se utiliza para precipitar el carbonato y evitar la posibilidad de pérdidas de CO<sub>2</sub> de la muestra durante la titulación con ácido. Una

muestra que produjo mucho CO<sub>2</sub> neutraliza mucho NaOH y al agregar el BaCl<sub>2</sub> formará un más precipitado blanco que una muestra baja en biomasa microbiana.

- 6- Se titulan las 15 muestras con HCl de título conocido con precisión (alrededor de 0, 15M) hasta que cambie el color de púrpura a blanco.

**Nota:**

Si, al agregar la fenolftaleína, el color se queda blanco en unos tratamientos (y se ve mucho precipitado), significa que el CO<sub>2</sub> consumió (neutralizó) todo el NaOH. En este caso se preparan nuevas trampas de NaOH 0,03N para estos tratamientos y se repite la incubación por media hora en vez de una hora.

## RESULTADOS

- 1- Se calcula el promedio de los triplicados (mL HCl gastados en la titulación del NaOH remanente, i.e no neutralizado por el CO<sub>2</sub> durante la incubación de las muestras en el aparato de flujo continuo de aire).
- 2- Se calcula la diferencia con el volumen de HCl usado para los frascos sin suelo. Este volumen debe más alto que las muestras y reflejan la cantidad de equivalentes de la base disponibles a ser neutralizados en las alícuotas en toda la corrida de la muestras.
- 3- Se multiplica por la molaridad del HCl (x mol/L o x mmol/mL).
- 4- Se multiplica por 6 (mg CO<sub>2</sub>-C/meq de H<sup>+</sup>)
- 5- Se divide por el período de burbujeo en las trampas (lh)

- 6- Se multiplica por 2 (u otro factor dependiendo del contenido de agua en las muestras) para expresar el resultado con base de 100g de suelo seco (mg CO<sub>2</sub>-C/h.100 g seco)

- 7- Se multiplica por 0,75 para obtener la concentración de la biomasa microbiana (mg Cmic/g seco; Cmic = C microbiano).

Ahora tenemos, para el tratamiento 'suelo+abono' y para el tratamiento 'solo suelo', 2 valores de biomasa microbiana: la biomasa base o residente del material y la biomasa después de 2 días de incubación con glucosa. Esta última la llamamos 'biomasa crecida'.

### Contenido en nutrimentos disponibles a corto plazo (1-2 Meses)

Esta cantidad coincide con los nutrimentos del abono que las bacterias lograron absorber durante los dos días de crecimiento después de agregar la glucosa. Para calculada se saca la diferencia entre la biomasa crecida y la biomasa base para la mezcla suelo+abono. Luego, para tener en cuenta solamente los nutrimentos conseguidos en el abono y no los conseguidos en el suelo, se saca la diferencia entre 'biomasa crecida' y la 'biomasa base' también para el suelo solo y se deduce este valor del resultado anterior. asea:

$$[B_{\text{crecida}} - B_{\text{base}}]_{\text{mezcla}} - [B_{\text{crecida}} - B_{\text{base}}]_{\text{suelo}} \text{ ecuación (1)}$$

en donde B = biomasa. El resultado, que tiene unidades de [mg Cmic/ g] o [mg Cmic/ 100mg abono], indica la cantidad de biomasa microbiana que se puede generar a partir de los nutrimentos contenidos en el abono orgánico. Debido a que las concentraciones de N, P, Y K en las bacterias son aproximadamente 6, 13, Y 20 veces menores, respectivamente, que la concentración en C (Powlson *et al.* 1987; Brookes *et al.* 1987; Anderson and Domsch 1980), se divide el Cmic por 6, 13, o 20

para obtener los mg de N, P, o K disponibles en 100 mg de abono. Esta cifra podría ser una subestimación si existen cantidades mayores de las necesarias de un elemento respecto allimitante pues el crecimiento microbiano, al igual que el crecimiento de las plantas, estaría en función del elemento limitante. Actualmente se realizan estudios para calibrar la técnica para los elementos mayores. Por ejemplo, si el N es limitante podría absorberse menos P, aunque esté disponible.

Otra manera útil de expresar los resultados es el 'equivalente de fertilizante químico'. Aquí se calcula la proporción de abono orgánico que hay que mezclar con suelo para lograr una fertilización óptima. Se usa la ecuación siguiente:

$$y = 37 X + 27 \quad \text{ecuación (2)}$$

en dónde X es el resultado del cálculo anterior [mg Cmic/100 mg abono] y Y es el porcentaje del rendimiento máximo (logrado con fertilización química óptima) que se consigue al agregar una parte de abono a nueve partes de suelo (10%; peso seco/peso seco). O sea, si se agrega a un suelo 10% de un abono orgánico con valor de bioensayo 1.97 [mg Cmic/ 100 mg abono], sigue que Y = 100 Y que los 10% de abonos suministran tantos nutrientes como una fertilización química óptima. Si, por ejemplo, Y = 75, se colige que hay que agregar 13,3% (10% x 100/75) de abono para suministrar suficientes nutrientes. Si y = 200, bastaría con 5% de abono.

#### Nota:

Esta ecuación se calibró con un experimento en el cual se midió al mismo tiempo el crecimiento de sorgo en macetas y este bioensayo microbiano para mezclas suelo:abono 00%) hechas con 22 tipos distintos de abonos orgánicos (Vandevivere y Ramírez 1995b).

### Contenido en nutrientes disponibles a mediano plazo (6 Meses)

Se calcula de igual manera que para el corto plazo, excepto que no se sustrae el valor de la biomasa base (inicial) del valor de la 'biomasa crecida', tanto para el tratamiento con abono como para el testigo con solo suelo.

### Contenido en nutrientes disponibles a largo plazo (2 Años)

Conviene recordar que los abonos orgánicos continúan liberando nutrientes por varios años. Se considera con base a información obtenida en zonas templadas (p.ej. Días *et al.* 1993), que un abono orgánico usualmente libera aproximadamente una tercera parte de su contenido total de N durante el primer año, otra tercera parte el segundo año y el resto después. Nosotros dudamos que tal repartición del N disponible en el tiempo sea válido para todos los abonos orgánicos. Tales dudas surgen al considerar el N disponible a mediano plazo, tal como arriba se indicó, correspondió al 6,5% + 4,3% del N total en el caso de 7 abonos más pobres y a 46,0% + 18,5% en el caso de los 8 abonos mejores (Vandevivere y Ramírez 1995a).

Obviamente la tasa de liberación del N fue más alta para los abonos altos en nutrientes. De esta forma no se puede generalizar la disponibilidad de N tal como lo sugirieron los autores citadas.

### Escala relativa de valor fertilizante de abono

calificación abono	ecuación (1) mgC.microb./ 100 mg	1000/Y = dosis (%) de abono que hay que mezclar con suelo para proporcionar suficientes nutrientes
pobre	< 0,3	> 26
mediano	0,3 - 1,0	16 - 26
bueno	1,0 - 2,0	10 - 16
excelente>	2,0	< 10

Ejemplo:

Se obtienen los valores siguientes:

suelo solo:

biomasa base = 0,3 mg Cmic/100 mg abono

biomasa crecida = 1,8

mezcla suelo + abono:

biomasa base = 0,8

biomasa crecida = 5,6

El resultado final sería entonces:

$(5,6-0,8) - (1,8-0,3) = 3,3$  mg Cmic/100 mg abono.

Entonces, 100 mg de abono proporcionarían, a corto plazo, 0,55 mg de N, 0,25 mg de P (0,58 mg de  $P_2O_5$ ), y 0,17 mg de K (0,20 de  $K_2O$ ). Este abono correspondería a un 0,55-0,58-0,2.

Por otro lado, al despejar la ecuación 2, se obtendría un valor de y de 138. Dividiendo 1000/ Y, se obtiene un valor de 6,7% que sería la proporción abono/suelo en la cual se espera una fertilización óptima.

Para el mediano plazo, el resultado sería:

$5,6 - 1,8 = 3,8$  mg Cmic/100 mg abono

Correspondería a un abono tipo 0,67-0,23-0,19.

Estos últimos valores se pueden multiplicar por aproximadamente 3, para obtener los valores fertilizantes a largo plazo que serían 1,84-2,0-0,69.

En nuestra experiencia se han evaluado abonos de muy alta calidad que aportan valores de más de 8 mg Cmic./100 mg de abono. En los ejemplos anteriores Cmic/100mg de abono de 3,3 y 3,8 mg en términos de N disponible a corto plazo se estaría en el orden de los 13 kg/toneladas de abono seco. Dada la naturaleza de la liberación lenta del N se espe-

ra una eficiencia de absorción mayor que si se tratara de un fertilizante químico.

Esta metodología aporta un punto de comparación de la calidad nutricional de los fertilizantes lo cual es un punto de referencia no solamente para su dosificación en el campo sino también para establecer comparaciones de costos y equivalencias de fertilizante. En trabajos futuros se calibrará la prueba con pruebas de campo con el fin de aumentar su confiabilidad.

### Agradecimiento:

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Gobierno de Bélgica, Ministerio de Asuntos Extranjeros, Comercio Exterior y la Cooperación para el Desarrollo, la compañía PIP ASA, La Universidad de Costa Rica y los autores.

### LITERATURA CITADA

- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. 1980. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Sci.* 130:211-216.
- BRENDECKE, J. W.; AXELSON, R. D.; PEPPER, I. L. 1993. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long-term effects of municipal sewage sludge on an arid soil. *Soil Biol. Biochem.* 25:751-758.
- BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. 1984. Phosphorus in the soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 16:169-175.
- CHENG, W.; COLEMAN, D. C. 1989. A simple method for measuring  $CO_2$  in a continuous air flow system: modification to the substrate-induced respiration technique. *Soil Biol. Biochem.* 21:385-388.
- CLARK, F.E. 1965. Agarplate method for total microbial count, pp. 1460-1466. *In: CA Black CE.*

- 
- Methods of soil analysis, Part 2, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- DIAZ, L.F.; SAVAGE, G.M.; EGGERTH, L.L.; GOLVEKE, C.G. 1993. Composting and recycling municipal solid wastes. Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- MEHUCH, A.; FRED, E.B.; TRUOG, E. 1934. The *Cunninghamella* plaque method of measuring available phosphorus in soil. *Soil Sci.* 38: 445-458.
- MEHLICH, A.; TRUOG, E.; FRED, E.B. 1933. The *Aspergillus niger* method of measuring the available potassium in soil. *Soil Sci.* 35:259-277.
- MOOERS, C.A. 1938. An evaluation of the Neubauer and the *Cunninghamella* and *Aspergillus niger* methods for the determination of the fertilizer needs of a soil. *Soil Sci.* 46:211-227.
- PARTON, W.J.; SANFORD, R.1.; SANCHEZ, P.A. 1989. Modelling Soil Organic Dynamics in Tropical Soils, pp. 152-171. *In:* Coleman, D. C; Oades, J. M and Uehara., G. (ed.) Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems. NIFTAL Project, Paia, Hawaii.
- POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; CHRISTENSEN, B.T. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 19: 159-164.
- RUSCH, H.P. 1972. La fécondité du sol. Le courrier du livre, Paris. Translated from Bodenfruchtbarkeit; eine studie biologischen denkens, 1968, K.F. Haug Verlag, Heidelberg.
- WAKSMAN, S.A.; STARKEY, R.1. 1923. Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility: VII. Carbon dioxide evolution. *Soil Sci.* 17:141-161.
- VANDEVIVERE, P.; RAMIREZ, C. 1995a. Nutrient value of organic fertilizers: 1. Conventional assays. Sometido a Applied Soil Biology.
- VANDEVIVERE, P.; RAMIREZ, C. 1995b. NUTRIENT VALUE OF ORGANIC FERTILIZERS: II. Microbial assay. Sometido a Applied Soil Biology.
-