

COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE ÁCIDOS GRASOS EN SUELOS AGRÍCOLAS MEDITERRÁNEOS CON ROTACIÓN TRIGO (C3)-MAÍZ (C4) Y LA INCORPORACIÓN DE LOS RESIDUOS DE COSECHA

Layla M. San-Emeterio¹, Ian D. Bull², Jens Holtvoeth², Rafael López-Núñez¹, José A. González-Pérez¹

¹*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Avenida Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, lmarsan@irnas.csic.es*

²*Organic Geochemistry Unit, School of Chemistry, University of Bristol (U.K.)*

Resumen: Los lípidos del suelo son sustancias de origen vegetal o microbiano, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Esta fracción orgánica incluye biomarcadores asociados a diferentes comunidades microbianas y proporciona información sobre la dinámica de la materia orgánica del suelo (MOS) y de los intercambios de carbono. En este trabajo presentamos los resultados preliminares obtenidos en un experimento de marcaje isotópico natural en un suelo agrícola mediterráneo de la estación experimental "La Hampa" (Sevilla), sometido a rotación de cultivos trigo (C3)-maíz (C4). La fracción lipídica del suelo se estudia a distintas profundidades mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y su composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) se determinó en compuestos específicos mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC-C-IRMS). Tras sólo dos años de cambio a cultivo de maíz y de aportes de su biomasa al suelo, se encontró un enriquecimiento significativo de $\delta^{13}\text{C}$ (c. 2 ‰) para los FAME saturados C_{20} , C_{22} y C_{23} y el monoinsaturado FAME $\text{C}_{22:1}$ y de hasta 5 ‰ en alcanos C_{29} y C_{31} . No se encontraron diferencias significativas para los alcoholes e hidroxiácidos. Estos cambios isotópicos pueden deberse a una mayor especificidad de los alcanos de cadena larga de origen vegetal, mientras que los otros compuestos son menos específicos y pueden tener un origen diverso. No se observaron diferencias significativas en la composición isotópica de la MOS a las diferentes profundidades del suelo dentro de un mismo tratamiento. Todo ello, junto al bajo contenido en materia orgánica (MO) que se mantiene constante a pesar de la cantidad de biomasa C4 agregada durante el cultivo, apunta a altas tasas de mineralización y a una rápida transformación de los restos vegetales en estos suelos agrícolas mediterráneos.

Palabras clave: materia orgánica, isótopos estables, extracción de lípidos, biomarcadores

1. Introducción

Los biomarcadores se definen como compuestos que pueden cuantificarse y extraerse de los suelos, que son estables y que mantienen un precursor biosintético específico. Por ello, la estructura química de los biomarcadores puede proporcionar información valiosa sobre distintos aspectos biogeoquímicos en suelos, como la evolución de su materia orgánica y de otros procesos ambientales. Sin embargo, los métodos para extraer e identificar biomarcadores suponen un reto analítico, especialmente en aquellos suelos con bajo contenido en MO, como es el caso de la mayoría de suelos mediterráneos. Como ejemplo de biomarcadores adecuados para estudiar la dinámica de la MOS se encuentran hidrocarburos sencillos como los *n*-alcanos, que presentan una alta estabilidad en los suelos y que pueden informar sobre el estado de evolución y estabilidad de la MOS. Compuestos como los *n*-alcoholes se degradan más rápidamente y otros compuestos, como los ácidos grasos y esteroides, muestran una estabilidad intermedia y cuya funcionalidad y grado de saturación en suelos y sedimentos va variando con el tiempo (Tu y col., 2017).

Las prácticas agrícolas afectan a la tasa de degradación, composición y condiciona la estabilización del carbono orgánico (CO) en los suelos. De hecho, la agricultura se considera el principal factor de pérdida de C de los suelos. Una gestión adecuada de

los suelos agrícolas y de las prácticas culturales es fundamental para la conservación del CO y para contribuir al secuestro de carbono. Esto es particularmente relevante en suelos semiáridos de carácter mediterráneo, normalmente con contenidos de MO muy bajos y altas tasas de mineralización. Teniendo en cuenta que la principal fuente de CO en suelos es de origen vegetal, las rotaciones de cultivo y los aportes de biomasa al suelo son prácticas agrícolas de particular relevancia que pueden modular el ciclo geoquímico del C.

El objetivo de este estudio es estudiar la dinámica de la MOS en suelos agrícolas mediterráneos mediante un experimento de marcaje isotópico natural que utiliza la rotación de cultivos con distinta composición isotópica de carbono (fotosistema C3-C4). Se estudia particularmente la fracción de lípidos libres del suelo, se identifican las principales familias de marcadores moleculares y se monitoriza su composición isotópica en el tiempo y a distintas profundidades del suelo.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño experimental y toma de muestras

El experimento de rotación de cultivo con fotosistema C3 (trigo) a fotosistema C4 (maíz) se inició en 2015 en la finca experimental del IRNAS-CSIC “La Hampa”, localizada en Coria del Río (Sevilla), como parte del proyecto INTERCARBON. Para el presente estudio se tomaron muestras en octubre de 2017, a tres profundidades distintas (5, 20 y 40 cm), en diferentes tratamientos: control con vegetación natural (CN), control agrícola (CA), parcelas de plantación en las que se dejó el sistema radicular del maíz (R) y parcelas de plantación donde se aplicó biomasa de maíz triturada y compostada en superficie (B) (Figura 1). Las muestras fueron tamizadas descartando la fracción > 2 mm.

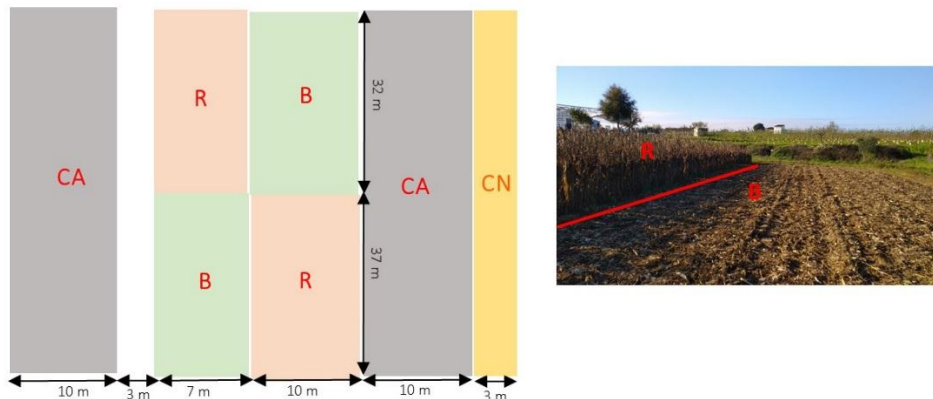


Figura 1. Diseño experimental establecido en la finca experimental “La Hampa” del IRNAS-CSIC.

2.2. Extracción y análisis de lípidos

Los lípidos libres del suelo se extrajeron de 7 gramos de suelo mediante extracción asistida por microondas (Microwave Extraction System, Ethos, EX) durante 45 minutos utilizando una mezcla de diclorometano:metanol (DCM:MeOH, 3:1). El extracto lipídico se concentró en un rotavapor y se secó eliminando restos de agua de la extracción utilizando una columna de sulfato de sodio (anhidro).

2.2.1. Derivatización y metilación

Para los posteriores análisis por cromatografía de gases (GC), se necesita derivatizar los compuestos para facilitar su separación cromatográfica. Los compuestos se metilaron utilizando una mezcla de cloruro de acetilo en metanol (1:30)

durante 12 horas a 45°C. Para eliminar el exceso de ácido (acético y clorhídrico), el extracto se pasó por una columna de carbonato de potasio. Finalmente, se silanizaron aquellos compuestos que contuvieran grupos hidroxilos empleando N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, con 1% trimetilclorosilano), a 65°C durante 30 minutos. El detalle del protocolo usado se encuentra en Holvoeth et al. (2010).

2.2.2. Análisis de composición por cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis por GC-MS de las muestras derivatizadas se empleó un GC Trace 1300 Series (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple (MS) ISQ-LT, Thermo Scientific. Los compuestos orgánicos se identificaron mediante análisis de sus espectros de masas (m/z) y sus correspondientes tiempos de retención. La cuantificación de los compuestos se realizó por comparación con el estándar interno 5 α (H)-colestano, del cual se añadió un volumen exacto a cada muestra antes de proceder a su extracción por microondas. Este estándar no interfiriere con ninguno de los compuestos presentes.

2.2.3. Análisis isotópico de compuestos específicos separados cromatográficamente (GC-C-IRMS)

La caracterización de la composición isotópica de los compuestos previamente identificados mediante GC-MS, se llevó a cabo en un GC modelo 7890A (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de relaciones isotópicas (IRMS), Isoprime GC5 100 (Elementar). Para poder obtener cromatogramas comparables y asignar de manera fiable un valor isotópico a cada pico identificado en GC-MS, las condiciones cromatográficas se mantuvieron iguales a las descritas en el apartado 2.2.2. En la Figura 2 se muestran dos trazas cromatográficas obtenidas mediante GC-IRMS y GC-MS, dónde se aprecia la correspondencia de los picos cromatográficos. Finalmente, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en los compuestos derivatizados se corrigieron teniendo en cuenta el valor isotópico del C del grupo funcional añadido por el metanol durante el proceso de metilación (mezcla con cloruro de acetilo). Los cálculos se hicieron según Rieley (1994).

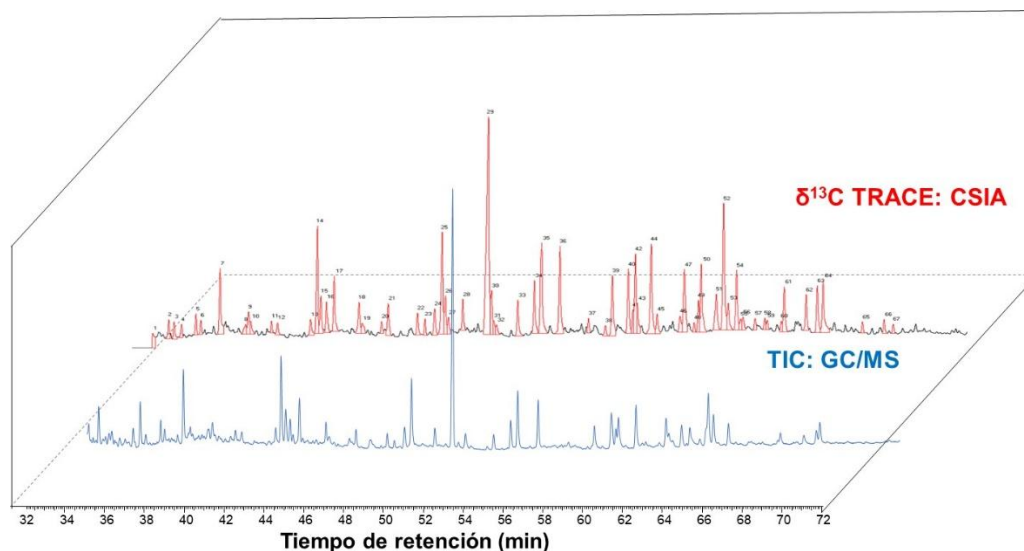


Figura 2. Cromatogramas obtenidos de la derivatización del TLE en GC-MS (azul), y su correspondencia representada según el ion 44 ($\delta^{13}\text{C}$) en análisis de compuestos específicos, conocido también como CSIA (ion 44) (rojo).

2.4. Análisis estadístico

Previo a cualquier prueba estadística, se comprobaron las asunciones de normalidad y homocedasticidad empleando los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Cuando dichas asunciones se se cumplían ($p > 0.05$), las diferencias entre los distintos tratamientos, profundidad y familia de compuestos se evaluaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), o en su defecto test de Kruskal-Wallis. Las diferencias significativas se indicaron según los test *post-hoc* de Tukey (HSD) y Dunn, para pruebas paramétricas y no paramétricas respectivamente.

3. Resultados y Discusión

Se detectaron varias familias de compuestos que se identificaron por GC-MS (FAME: totales, insaturados, ramificados y con grupos hidroxilo; *n*-alcoholes; *n*-alcanos; esteroides). En la Figura 3, se muestran las distintas familias de compuestos para los que obtuvimos valores de su composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en el análisis CSIA.

Se encuentra que, en relación a los dos controles, los valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$) en los dos tratamientos en que se aplicaron restos vegetales del cultivo de maíz (“biomasa”), mostraron un enriquecimiento significativo de $\delta^{13}\text{C}$ de hasta 2 ‰ para los ácidos grasos (FAME) saturados (C_{20} , C_{22} y C_{23}) e insaturados ($\text{C}_{22:1}$), (Figura 3). Las mayores diferencias (5 ‰) se observan en el grupo de *n*-alcanos (concretamente, C_{29} y C_{31}). No se encontraron diferencias significativas para el grupo de *n*-alcoholes ni para los ácidos grasos con grupo hidroxilo (*ω -hydroxy FAME*), lo que probablemente se deba a su baja especificidad (Méndez-Millán y col., 2014). Por último, los controles, tanto agrícola como natural, no presentaron diferencias entre sí (Figura 3).

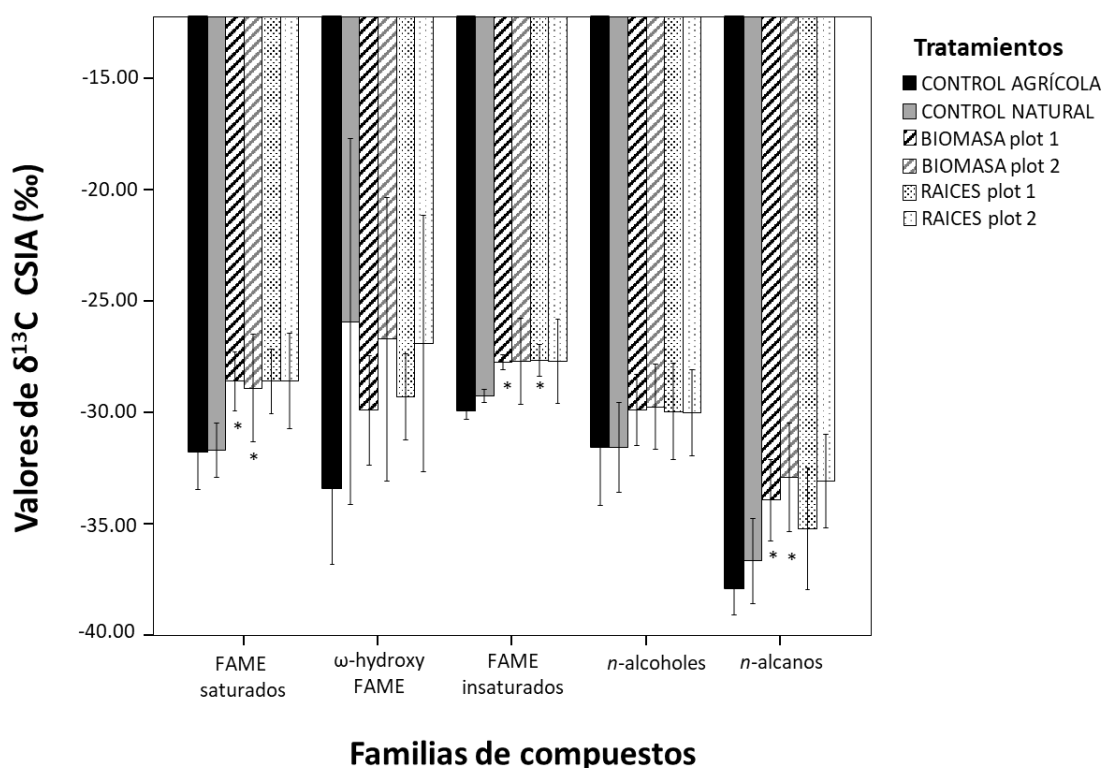


Figura 3. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ -CSIA (media \pm desviación estándar; $n=3$) para cada familia de compuestos. * indica diferencias significativas entre tratamientos respecto a los controles ($p < 0.05$).

No se observaron diferencias significativas en la composición isotópica de la MOS respecto a la profundidad de muestreo, sin embargo sí se observa un ligero enriquecimiento de 1.5 ‰ en la capa más superficial del suelo (primeros 5 centímetros). Cabe destacar que el contenido de MOS es bastante pobre (< 1.3 %; datos no presentados), y que permaneció constante en los dos años de duración de este experimento, lo que indica la ocurrencia de altos niveles de mineralización en estos suelos con un rápido intercambio e incorporación de material vegetal a la MOS.

4. Conclusiones

Este estudio preliminar sobre la caracterización isotópica de compuestos específicos, demuestra que la fracción de lípidos libres del suelo puede revelar información sobre cómo los cambios en las prácticas de manejo afectan a la calidad de la MOS y a su tasa de intercambio. Esto es así incluso cuando los cambios se han producido en un corto espacio de tiempo (dos cultivos). Los alcanos de cadena larga constituyen la fuente más fiable de información sobre los aportes vegetales y la aplicación de biomasa. Por otro lado, los ácidos grasos saturados resultan también de utilidad con un uso potencial para estimar tasas de intercambio de carbono en estos suelos bajo rotación de cultivos. Aunque el experimento está aún en marcha y que se están actualmente realizando experimentos complementarios de mineralización en campo y en laboratorio, comenzamos a conocer mejor la influencia de distintos sistemas de manejo agrícolas en la dinámica del C en estos suelos agrícolas mediterráneos, muy pobres en materia orgánica y con altas tasas de mineralización.

5. Bibliografía

- Mendez-Millan, M., Dignac, M. F., Rumpel, C., & Derenne, S. (2011). Can cutin and suberin biomarkers be used to trace shoot and root-derived organic matter? A molecular and isotopic approach. *Biogeochemistry*, 106(1), 23-38.
- Holtvoeth, J., Vogel, H., Wagner, B., & Wolff, G. A. (2010). Lipid biomarkers in Holocene and glacial sediments from ancient Lake Ohrid (Macedonia, Albania). *Biogeosciences*, 7(11), 3473-3489.
- Rieley, G. (1994). Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes. *Analyst*, 119(5), 915-919.
- Tu, T. T. N., Egasse, C., Anquetil, C., Zanetti, F., Zeller, B., Huon, S., & Derenne, S. (2017). Leaf lipid degradation in soils and surface sediments: A litterbag experiment. *Organic Geochemistry*, 104, 35-41.

6. Agradecimientos

Se agradece al MINECO y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) la financiación del proyecto CGL2016-78937-R. A Desiré Monis Carrere por la asistencia técnica en laboratorio.