

EL “*TRENCHING*” COMO MÉTODO DE SEPARACIÓN DE LAS COMPONENTES DE LA RESPIRACIÓN DE SUELOS FORESTALES

Eugenio Díaz-Pinés López de los Mozos¹, Andreas Schindlbacher², Robert Jandl³ y Agustín Rubio Sánchez¹

¹ Departamento de Silvopascicultura. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n. 28040-MADRID (España.) Correo electrónico: ediazpines@gmail.com

² Institute of Forest Ecology. University of Natural Resources and Applied Life Sciences. Peter Jordan Stra, e 82. A-1190 VIENA (Austria).

³ Federal Office and Research Centre for Forests. Seckendorf Gudent Weg 8. A-1131 VIENA (Austria)

Resumen

Técnicas como el *trenching* permiten la separación de las componentes de la respiración de suelos forestales. Sin embargo, dicha técnica lleva asociada una serie de alteraciones sobre el suelo que es preciso analizar para evaluar de forma más precisa sus resultados. En este estudio se realizó un experimento comparando parcelas en las que se había efectuado un *trenching* con otras no tratadas, tomando muestras periódicamente con las que llevar a cabo un seguimiento de la evolución de las raíces y de los diferentes grupos de microorganismos edáficos. Para esta última tarea, se analizaron los ácidos grasos fosfolipídicos (PLFAs), que poseen un alto valor como identificadores de bacterias, hongos, actinomicetos y micorrizas arbusculares. Quince meses después de haber realizado el *trenching*, el volumen y longitud de las raíces presentes no había cambiado significativamente respecto a las parcelas control; los PLFAs asociados a microorganismos no sufrieron variaciones de importancia. En base a estos resultados, se puede concluir que, al menos hasta 15 meses después de la realización del *trenching*, las posibles mediciones de flujos de CO₂ en parcelas *trenching* y control resultarían válidas para valorar la contribución de las componentes heterótrofa y autótrofa de la respiración del suelo.

Palabras clave: *Respiración autótrofa, Respiración heterótrofa, Raíces, PLFA*

INTRODUCCIÓN

Los suelos forestales emiten CO₂ a la atmósfera -en el proceso de respiración- procedente de la actividad de raíces y de microorganismos. Mientras que la actividad de los organismos heterótrofos es proporcional a la disponibilidad de C del suelo, la actividad de las raíces es más o menos independiente de los depósitos de C edáfico. Esto es debido a un uso

de diferentes fuentes de C, haciéndose crucial un mayor entendimiento de ambas componentes (KIRSCHBAUM, 1995).

Entre los distintos métodos usados para el discernimiento de ambas componentes de la respiración del suelo se encuentra el *trenching*, en el que las raíces son aisladas de la parte aérea de las plantas y, por tanto, se elimina su contribución a la respiración del suelo. El método es relativamente simple (HANSON et al., 2000) y, al menos en deter-

minados casos, puede provocar efectos en el suelo similares a los causados por las cortas a hecho, ya que también se produce una interrupción de la comunicación entre la raíz y la parte aérea del árbol (SIIRA-PIETIKÄINEN et al., 2001). Sin embargo, esta técnica puede llevar asociadas alteraciones como invasión de herbáceas (HANSON et al., 2000), respiración residual de raíces (EWEL et al., 1987), así como diversos cambios en la composición de la comunidad microbiana edáfica (KUZYSKOV, 2006; SIIRA-PIETIKÄINEN et al., 2001). Así pues, es necesario evaluar los cambios provocados por esta técnica para una mejor interpretación de los resultados obtenidos.

En este trabajo se contribuye al mejor entendimiento de las ventajas y las limitaciones del trenching como método de separación de las componentes de la respiración del suelo, con la intención de valorar las alteraciones que provoca en el medio. Para ello, (1) se estudió el cambio que experimentaron las raíces en parcelas sometidas a trenching respecto a control, en cuanto a longitudes, diámetros medios y volúmenes; y (2) se caracterizó en distintos momentos la composición de la comunidad microbiana edáfica a través del análisis de los ácidos grasos fosfolípidicos (*Phospholipidic Fatty Acid, PLFA*), que han sido utilizados como identificadores de los diferentes grupos de microorganismos que pueblan el suelo (FINDLAY, 2004).

METODOLOGÍA

Descripción de la zona de estudio

El área de estudio se encuentra en *Mühleggerköpfl*, a 895 m s.n.m. (11°38'21" E; 47° 34'50"N), en los denominados Alpes Calizos del Tirol del Norte, Austria. El clima es húmedo fresco, con un máximo de precipitaciones en verano; el periodo libre de nieve dura desde Abril o Mayo a Octubre o Noviembre. La vegetación actualmente es un bosque en el que domina *Picea abies* (L.) Karst, y son frecuentes *Abies alba* Mill y *Fagus sylvatica* L. (ENGLISCH & STARLINGER, 1996); siendo la edad de la masa de unos 130 años. Los suelos son Cambisoles crómicos con profundidades entre 30 y 60 cm, con presencia de Leptosoles rendzínicos de escasa profundidad (15-30 cm), junto con otros tipos con los que apa-

rece en una gran variabilidad incluso en escalas muy reducidas (ENGLISCH, 2001).

Diseño del experimento

Se consideraron 6 parcelas (2x2 m): 3 denominadas "control", sobre las que no hubo actuación alguna, y otras 3 denominadas "trenching" en las que se llevó a cabo una zanja perimetral, de 10 cm de ancho y profundidad variable hasta alcanzar la roca madre (situada a una profundidad media de 50 cm). A continuación se instaló una capa plástica para impedir la reentrada de raíces y se rellenaron las zanjas cavadas. Estas se llevaron a cabo el 23 de Junio de 2005. La vegetación herbácea fue eliminada periódicamente, dado que la ausencia de competencia con las raíces podría facilitar excesivamente su aparición.

En tres fechas diferentes (23 de Junio de 2005, 10 de Noviembre de 2005 y 27 de Septiembre de 2006) se extrajeron tres cilindros (15 cm de longitud, 7 cm de diámetro) de cada una de las seis parcelas. Dichos cilindros fueron almacenados en nevera, trasladados al laboratorio y conservados a -18°C en congelador hasta su posterior análisis.

Análisis de ácidos grasos fosfolípidicos

La extracción de fosfolípidos y el análisis de PLFAs fue realizado según propuesta de FROSTEGÅRD et al., (1993) y modificaciones de HACKL et al., (2005). Para detalles, consultar DÍAZ-PINÉS (2007). La suma de PLFA considerados de origen bacteriano (i15:0, a15:0, 16:1(9), i16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 18:1(11), cy19:0) representó la biomasa bacteriana (FROSTEGÅRD et al., 1993); del mismo modo, el PLFA 18:2(9,12c) fue usado como indicador de biomasa fúngica (OLSSON, 1999); el PLFA 10 Me17:0 fue usado como indicador de biomasa de actinomicetos; por último, el PLFA 16:1(11) se usó como indicador de biomasa de micorrizas arbusculares (OLSSON, 1999). La relación entre los ácidos grasos cíclicos cy17:0 y cy19:0 y sus precursores monoinsaturados fue usada como un indicador de estrés de las poblaciones bacterianas (GROGAN & CRONAN, 1997), recibiendo el nombre de factor fisiológico.

Análisis de raíces

La separación y limpieza de raíces se hizo mediante un sistema hidroneumático (*GVF Root*

Washer, Hydropneumatic Elutriation System, Gillison's Variety Fab, MI, USA); con el que la separación, mecánica, se consigue usando agua a presión y aire comprimido en un sistema cerrado, para aislar y depositar las raíces en un tamiz sumergido (SMUCKER *et al.*, 1982). Una limpieza manual final fue necesaria para desprender partículas todavía adheridas a las raíces. Las imágenes de las raíces, se captaron por medio de un escáner (*WinRhizo LA 1600*, Régent Instruments, Québec, Canadá). Las raíces fueron sumergidas en una bandeja de plexiglás con agua destilada, evitando su solapamiento, y escaneadas a una resolución de 300 dpi. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa *WinRhizo* (Régent Instruments, Québec, Canadá), obteniéndose como resultado datos de diámetros medios, longitud, volumen y superficie de raíces, tanto total como por clases diamétricas. Posteriormente, las raíces fueron secadas en estufa (65°C, 24 horas) y pesadas para la obtención de su peso seco. En el caso de las raíces muestreadas en Septiembre de 2006, se calculó su contenido en C orgánico y N total a través de su combustión seca con un analizador automático de C y N (*Leco CN 2000*, LECO Corp., St. Joseph, MI).

Análisis estadístico

Los datos procedentes de las distintas mediciones fueron analizados mediante un análisis factorial de la varianza (ANOVA) en aquellos casos en los que se cumplieron las condiciones de aplicación de dicho método; las variables sufrieron transformaciones en los casos necesari-

os, y cuando las transformaciones no consiguieron obtener las condiciones de aplicación, se recurrió a métodos de análisis estadísticos no paramétricos (Test de la U de Mann-Whitney). Para todos los cálculos se hizo uso del programa *SPSS para Windows, versión 15.0.1*. (NORUSIS, 2007). Las salidas gráficas se obtuvieron mediante el programa *SigmaPlot for Windows version 10.0* (Systat Software, Inc).

RESULTADOS

Ácidos grasos fosfolipídicos

En los cilindros muestreados no se observaron diferencias asociadas al tratamiento respecto al total de los PLFA asociados a los diferentes grupos de microorganismos edáficos, tanto considerando todas las fechas de muestreo ($F = 0,77$; g.l. = 1,39; $p=0,39$), como quince meses después de la aplicación del tratamiento, es decir, para la fecha del muestreo en septiembre de 2006 ($F = 0,25$; g.l. = 1,16; $p=0,62$) (Figura 1). Respecto a los PLFA asociados a cada uno de los grupos de microorganismos considerados (Figura 2), el tratamiento *trenching* tampoco repercutió en diferencias significativas para bacterias ($F = 0,95$; g.l. = 1,39; $p=0,34$), hongos ($F = 0,30$; g.l. = 1,39; $p=0,60$), actinomicetos ($F = 1,05$; g.l. = 1,39; $p=0,31$) ni para micorrizas arbusculares ($F = 0,24$; g.l. = 1,39; $p=0,63$). El resto de parámetros estudiados en relación a la biomasa microbiana edáfica fueron la relación

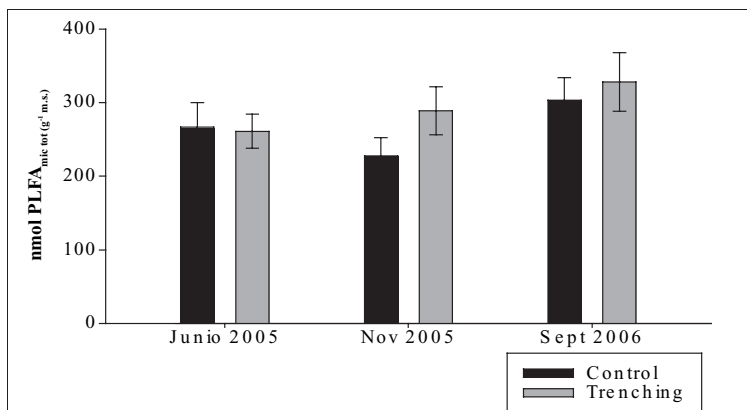


Figura 1. Contenidos de PLFAs asociados a comunidades microbianas

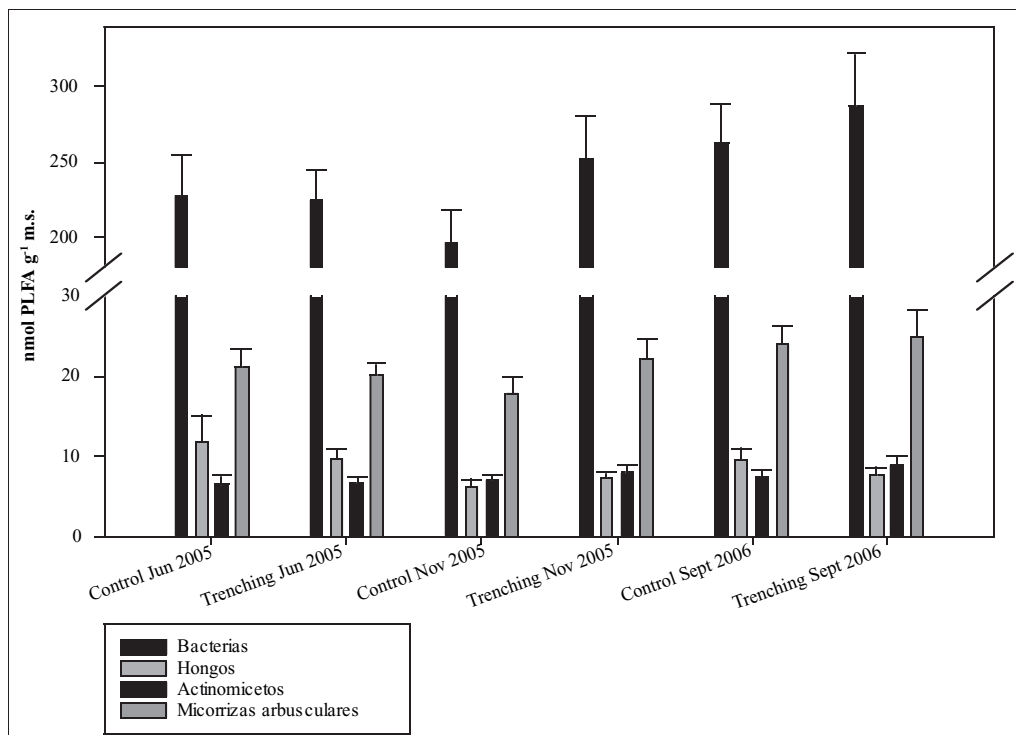


Figura 2. Contenidos de PLFA asociados a cada grupo de microorganismos para cada fecha de recogida de muestras

hongos/bacterias, en la que aparecieron diferencias significativas ($F = 4,30$; g.l. = 1,39; $p=0,05$) y el factor fisiológico (U de Mann-Whitney = 175, significación asintótica = 0,36).

Raíces

De entre todas las variables referidas a raíces, únicamente el diámetro medio sufrió un incremento en las parcelas sometidas a *trenching* (U de Mann-Whitney = 221, $p=0,01$); en cambio, no experimentaron cambios debidos al tratamiento la longitud ($F = 0,02$; g.l. = 1,52; $p=0,89$), el volumen ($F = 0,63$; g.l. = 1,52; $p=0,43$), el peso seco ($F = 0,95$; g.l. = 1,52; $p=0,33$). Las medias y errores estándar para cada variable en cada fecha se muestran en la tabla 1.

Los contenidos de C orgánico y N de las raíces en la última toma de muestras (C orgánico *trenching* $478,76 \pm 2,87$ mg.g⁻¹ y C orgánico *control* $482,66 \pm 2,58$ mg.g⁻¹; N total *trenching* $7,12 \pm 0,33$ mg.g⁻¹ y N total *control* $7,61 \pm 0,19$

mg.g⁻¹) no muestran diferencia alguna entre tratamientos ($F = 0,90$; g.l. = 1,16; $p=0,36$; y $F = 1,61$; g.l. = 1,16; $p=0,22$, respectivamente).

DISCUSIÓN

A pesar de ser una técnica aparentemente muy invasiva, las alteraciones producidas fueron moderadas puesto que el aislamiento de la rizosfera es inmediato y, desde la realización del *trenching*, las raíces sólo disponen de sus propios productos almacenados; estos compuestos orgánicos son los que poseen un menor tiempo medio de permanencia en el suelo (KUZYAKOV, 2006), por lo que es de esperar que la muerte de las raíces se produzca de una forma relativamente rápida. En el experimento las raíces estaban aparentemente vivas 5 meses después de la realización del *trenching*, no así en Septiembre de 2006 donde la totalidad de las raíces estaban

		Junio 2005	Noviembre 2005	Septiembre 2006
Longitud (m)	Control	18,89 ± 2,14	13,73 ± 1,63	11,79 ± 1,36
	Trenching	19,84 ± 3,14	15,06 ± 3,57	8,60 ± 1,81
Volumen (cm ³ dm ⁻³)	Control	24,93 ± 3,41	18,29 ± 1,81	14,73 ± 1,58
	Trenching	28,58 ± 3,10	20,85 ± 3,00	14,42 ± 2,23
Diámetro medio (mm)	Control	9,29 ± 0,04	9,62 ± 0,38	9,39 ± 0,33
	Trenching	10,15 ± 0,41	10,14 ± 0,54	10,88 ± 0,70
Peso seco (g)	Control	3,15 ± 0,57	4,10 ± 0,50	3,15 ± 0,48
	Trenching	3,97 ± 0,70	3,96 ± 0,63	3,56 ± 0,61

Tabla 1. Indicadores de presencia de raíces: longitud y peso seco (referidos a cilindro de extracción); volumen (referido a volumen efectivo de suelo) y diámetro medio

muertas en base a su morfología. Esta alta persistencia de las raíces, concuerda con resultados de experimentos similares realizados sobre masas de *Pinus sylvestris* L. (PERSSON, 1982) y bosques mixtos (MCCLAUGHERTY et al., 1984); asimismo, el hecho de que tan sólo tras el segundo año se haga evidente la inactividad de las raíces ha sido ya recogido, entre otros, por (HAGERMAN et al., 1999). De hecho, los parámetros definidores de la presencia de raíces apenas se vieron alterados; únicamente un aumento del diámetro medio, lo que parece indicar una descomposición más rápida de las raíces finas, aunque esta posible descomposición no influyó sobre variables como volumen, longitud o peso seco de las raíces. Asimismo, la igualdad de contenidos de C y N tanto en las raíces procedentes de *trenching* como en las procedentes de control, parece indicar una escasa alteración en su composición.

Los resultados sobre la biomasa microbiana edáfica parecen seguir un comportamiento similar al de las raíces: ausencia de alteraciones de relevancia. La cantidad de PLFA asociados a microorganismos permanece constante a lo largo de todo el experimento; únicamente el porcentaje de PLFA asociados a comunidades bacterianas sufrió un incremento (datos no mostrados), junto con la relación Hongos/Bacterias. El aumento de esta relación parece indicar una mayor, aunque ligera, disponibilidad de productos sencillos (PFEFFER, comunicación personal), que son descompuestos por hongos, lo que es relacionable con la posible descomposición de las raíces de menor diámetro. El factor fisiológico, considerado como una medida de la adaptación de las células a condiciones adversas a través de una

forma especializada de C (GROGAN & CRONAN, 1997) sufrió fluctuaciones estacionales, si bien no aparecieron diferencias debidas al *trenching* y nunca sobrepasó el valor de 0,5, a partir del cual las poblaciones se pueden suponer bajo estrés (PFEFFER, comunicación personal).

CONCLUSIONES

La falta de cambios importantes en la presencia de raíces, aunque sí en su estado vital, unido a la inexistencia de alteraciones en las comunidades microbianas quince meses después de la realización del experimento, parece indicar que, en las condiciones del sitio de muestreo, los procesos de descomposición de raíces se realizan de forma muy lenta y el aporte de raíces producido por el *trenching* resulta excesivo para las capacidades de cambio de la biomasa microbiana edáfica. Por tanto, cabe esperar que las mediciones de respiración de suelo no se vean significativamente influenciadas por las alteraciones provocadas por el método, si bien la muerte de las raíces está asegurada y con ella la anulación de la contribución de las raíces a la respiración del suelo.

Agradecimientos

Quisiéramos agradecer a Michael Pfeffer, Veronika Bendl y Sophie Zechmeister-Boltenstern (BFW, Viena) su apoyo en el análisis de ácidos grasos; a Jürgen Friedel el préstamo del sistema hidroneumático de limpie-

za de raíces; y a Ernst Leitgeb su ayuda con el programa WinRhizo. Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el proyecto "AGL2004-01941/FOR" y la Acción Integrada "HU2005-0023" del MEC.

BIBLIOGRAFÍA

- DÍAZ-PINÉS, E.; 2007. *Influencia de las raíces sobre los microorganismos y la respiración de suelos forestales en Tirol (Austria)*. Proyecto Fin de Carrera. ETSI de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.
- ENGLISCH, M.; 2001. Standorts- und bodenkundliche Eigenschaften der Intensiv-Untersuchungsfläche Mühleggerköpfl / Nordtiroler Kalkalpen. In: F. Herman, S. Smidt & M. Englisch (eds.), *Stickstoffflüsse am Mühleggerköpfl in den Nordtiroler Kalkalpen*: 21-31. Forstliche Bundesversuchsanstalt Wien. Wien.
- ENGLISCH, M. & STARLINGER, F.; 1996. Woodland communities and sites at two altitude profiles near Achenkirch (The Tyrol). In: S. Smidt, F. Herman, D. Grill & H. Guttenberger (eds.), *Studies of ecosystems in the Limestone Alps- "Achenkirch altitude profiles"*: 33-54. Phytion. Horn.
- EWEL, K.C.; CROPPER, W.P.J. & GHOLZ, H.L.; 1987. Soil CO₂ evolution in Florida slash pine plantations. II: Importance of root respiration. *Can. J. For. Res* 17: 330-333.
- FINDLAY, R.H.; 2004. Determination of microbial community structure using phospholipid fatty acid profiles. In: G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans & J. D. van Elsas (eds.), *Molecular microbial ecology manual*: 983-1004. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- FROSTEGÅRD, Å.; BÄÄTH, E. & TUNLID, A.; 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 25(6): 723-730.
- GROGAN, D.W. & CRONAN, J.E., JR.; 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4): 429-441.
- HACKL, E.; PFEFFER, M.; DONAT, C.; BACHMANN, G. & ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil Biol. Biochem.* 37: 661-671.
- HAGERMAN, S.M.; JONES, M.D.; BRADFIELD, G.E.; GILLESPIE, M. & DURALL, D.M.; 1999. Effects of clear-cut logging on the diversity and persistence of ectomycorrhizae at a sub-alpine forest. *Can. J. For. Res.* 29: 123-134.
- HANSON, P.J.; EDWARDS, N.T.; GARTEN, C.T. & ANDREWS, J.A.; 2000. Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: a review of methods and observations. *Biogeochemistry* 48: 115-146.
- KIRSCHBAUM, M.U.; 1995. The temperature dependence of soil organic matter decomposition, and the effect of global warming on soil organic C storage. *Soil Biol. Biochem.* 6: 753-760.
- KUZYAKOV, Y.; 2006. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods. *Soil Biol. Biochem.* 38: 425-448.
- MCCLAUGHERTY, C.A.; ABER, J.D. & MELILLO, J.M.; 1984. Decomposition dynamics of fine roots in forested ecosystems. *Oikos* 42: 378-386.
- NORUSIS, M.; 2007. *SPSS 15.0 Statistical Procedures Companion*. Prentice Hall. Londres.
- OLSSON, P.A.; 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29(4): 303-310.
- PERSSON, H.; 1982. *Changes in the tree and dwarf shrub fine roots after clearcutting in mature Scots pine stand*. Swedish Coniferous Forest Project. Department of Systems Ecology, Swedish University of Agricultural Sciences. Tech Rep. 31. Uppsala.
- SIRA-PIETIKÄINEN, A.; HAIMI, J.; KANNINEN, A.; PIETIKÄINEN, J. & FRITZE, H.; 2001. Responses of decomposer community to root-isolation and addition of slash. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1993-2004.
- SMUCKER, A.J.M.; MCBURNEY, S.L. & SRIVASTAVA, A.K.; 1982. Quantitative separation of roots from compacted soil profiles by the hydropneumatic elutriation system. *Agron. J.* 74: 500-503.