

## EFECTO DE LA APLICACIÓN DE BIOCHAR AVÍCOLA SOBRE LAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE UN SUELO HAPLUSTOL TÍPICO CON DIFERENTES INTENSIDADES DE USO

MARIA FLORENCIA DOMINCHIN<sup>1-2</sup>; ROMINA A VERDENELLI<sup>\*1-2</sup>; SILVINA VARGAS GIL<sup>3</sup>; ANTONIO AOKI<sup>4</sup>; RAUL H MARIN<sup>2-5</sup>; JOSÉ M MERILES<sup>1-2</sup>

Recibido: 3/1/2019

Recibido con revisiones: 22/7/2019

Aceptado: 28/8/2019

### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de biochar elaborado a partir de excretas avícolas en suelos con un gradiente de intensificación de uso sobre sus propiedades químicas y microbiológicas. Tres sitios con diferente intensidad de uso fueron seleccionados: suelo prístino forestal (SP), suelo agrícola bajo manejo sustentable (MS), suelo agrícola bajo laboreo intenso (LI). El biochar fue aplicado a los suelos en cuatro dosis: sin biochar (control 0%) y con biochar en dosis del 1%, 3% y 10%. La aplicación de biochar incrementó el pH, la conductividad eléctrica (CE), el carbono orgánico total (COT), y la relación C/N. Altas concentraciones de biochar causaron un aumento de la actividad hidrolizante del diacetato de fluoresceína (FDA) en los suelos agrícolas, sugiriendo un incremento de la actividad microbiana total. Sin embargo, la aplicación de biochar produjo una reducción de la actividad deshidrogenasa, principalmente en MS y LI. Se observó un incremento de actinobacterias y hongos micorrícicos en suelos tratados con altas dosis de la enmienda. En general, la aplicación de biochar tendió a incrementar la abundancia de bacterias Gram negativas en comparación con el tratamiento control (sin biochar). Se detectaron importantes incrementos de los ácidos grasos fosfolípidicos totales (PLFA) luego de la aplicación de biochar en SP y LI, indicando un aumento de la biomasa microbiana total. Por este motivo, la aplicación de biochar podría ser de mayor utilidad en la recuperación de suelos con alto grado de degradación edáfica.

**Palabras clave:** biochar, intensidad de uso del suelo; propiedades químicas, enzimas del suelo, estructura de las comunidades microbianas

## EFFECT OF POULTRY BIOCHAR ON CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES IN A TYPICAL HAPLUSTOL SOIL UNDER DIFFERENT LAND-USE INTENSITIES

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the impact of different rates of poultry biochar on soil chemical and microbiological properties under a land-use intensity gradient. Three sites were selected: a pristine forest soil (SP), an agricultural soil under sustainable management (MS), and an agricultural soil under conventional tillage (LI). The biochar was applied at four different rates: without biochar (control 0%) and biochar at 1%, 3% and 10%. Poultry biochar increased pH, electrical conductivity (CE), total organic C (COT), and C/N ratio. In general, biochar applied at the highest rates increased the hydrolysis of fluorescein diacetate, suggesting an increase of total microbial activity. However, biochar applied at the highest rates significantly decreased dehydrogenase activity, mainly under MS and LI. Furthermore, an increase of actinobacteria and mycorrhizal fungi were observed in soils treated with the highest rate of biochar. In general, biochar tended to increase Gram-negative bacteria compared to control. Our study also showed an increase of total phospholipids fatty acids (PLFAs) in SP and LI, indicating that biochar can increase total microbial biomass. For this reason, the application of biochar could be of greater utility in the remediation of soils with a high level of edaphic degradation.

**Key words:** biochar, land use-intensity, soil chemical properties, soil enzymes, microbial community structure.

1 CONICET-Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV; CONICET-UNC).

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Córdoba, Argentina.

3 Instituto de Patología Vegetal, CIAP, INTA, Córdoba, Argentina.

4 Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), Córdoba, Argentina.

5 Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT; CONICET-UNC).

\* Autor de contacto: [rverdenelli@imbiv.unc.edu.ar](mailto:rverdenelli@imbiv.unc.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

El biochar es un material residual producido por la pirólisis de materia prima orgánica, y comúnmente utilizado como enmienda de suelos (Ducey *et al.*, 2013). En la última década, los efectos de la incorporación de material pirolizado sobre las propiedades del suelo han sido objeto de numerosas investigaciones, ya que su utilización se ha asociado, entre otras cosas, con mejoras en la calidad y fertilidad de los suelos (Purakayastha *et al.*, 2019), e incrementos en el almacenamiento de C (Sadeghi *et al.*, 2018) y de la productividad de los cultivos (Yu *et al.*, 2019). Entre los materiales que pueden ser utilizados en la elaboración del biochar, los desechos orgánicos industriales o forestales, han despertado un gran interés, ya que implican una solución potencial para el manejo de residuos (Zhang *et al.*, 2019). Tal es el caso del biochar producido a partir de excretas de aves generadas en las industrias avícolas. La adición de biochar, y particularmente aquellos obtenidos a partir de excretas y/o estiércol, pueden ser utilizados como una importante fuente de nitrógeno (N) para los cultivos (Ameloot *et al.*, 2015). Otros autores han propuesto al biochar avícola como una importante enmienda para incrementar la resistencia y resiliencia a la sequía en suelos tropicales (Liang *et al.*, 2014).

Zhu *et al.* (2017) sostienen que la variabilidad existente entre diferentes tipos de biochar hace que su efecto sobre el mejoramiento de la calidad de los suelos sea poco predecible. En este sentido, pocos estudios han sido realizados con biochar elaborado a partir de material de origen animal, como el de excretas de aves.

La aplicación de biochar produce cambios en las propiedades físico-químicas, la capacidad de retención de nutrientes y de agua (Zhu *et al.*, 2017). Es ampliamente aceptado que la adición de esta enmienda puede producir incrementos en la alcalinidad del suelo, dependiendo de la materia prima, temperatura de pirólisis y grado de oxidación (Chan & Xu, 2009). El biochar es un material con la capacidad de retener macronutrientes, y de alterar las propiedades químicas del suelo, tales como el contenido de N y sus tasas de mineralización (Ulyett *et al.*, 2014). Algunos estudios también han observado alteración de las

propiedades microbiológicas, como la actividad de enzimas involucradas en diferentes ciclos biogeoquímicos (Tian *et al.*, 2016) y en la estructura de comunidades microbianas (Ameloot *et al.*, 2015). Sin embargo, dichos cambios han sido evaluados en suelos con una sola intensidad de uso, sin profundizar en las potenciales diferencias que podrían observarse en la respuesta microbiana en suelos que presentan un grado de deterioro edáfico; éste es uno de los aspectos que se evaluará en el presente trabajo.

En Argentina, los grandes beneficios producidos por la intensificación y expansión de la agricultura en las últimas décadas estuvieron asociados con significativos impactos sobre el ambiente. Entre estas externalidades negativas se destaca a la degradación de los suelos (Andrade *et al.*, 2017). Según nuestro conocimiento, las investigaciones orientadas al estudio y evaluación del biochar como una potencial enmienda para suelos agrícolas con diferentes intensidades de uso en nuestro país, son escasos o bien, podrían estar en etapa de desarrollo. Frente a este escenario, los suelos de Argentina podrían representar un buen modelo para evaluar los efectos de la aplicación del biochar sobre la dinámica de las comunidades microbianas y sobre la calidad de este ecosistema. Este estudio se formula bajo la hipótesis de que la aplicación de biochar puede modificar las características microbiológicas y físico-químicas del suelo, con énfasis en aquellos sometidos a una mayor intensidad de uso agrícola. De esta manera, el objetivo fue evaluar el impacto de la aplicación de diferentes dosis de biochar elaborado a partir de excretas avícolas sobre la actividad de enzimas generalistas y específicas del ciclo del C, la biomasa total y sobre la estructura de las comunidades microbianas en suelos agrícolas que presentan diferente intensidad de uso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de suelo fueron tomadas en un establecimiento de producción agrícola ubicado 25 km al sur de la Ciudad de Córdoba (31°37' S 65°14' W). Tres sitios con diferente intensidad de uso fueron seleccionados: suelo prístino forestal (SP), suelo agrícola bajo manejo sustentable con diecisiete años de rotación 2:1 (soja – maíz)

conducido en siembra directa (MS) y suelo agrícola bajo laboreo intenso con más de diez años de monocultivo de soja conducido con labranza convencional y siete años de rotación 2:1 (soja – maíz) conducido en siembra directa (LI), en acuerdo con Campitelli *et al.* (2010). El suelo fue clasificado como Haplustol típico con textura franco-limosa (26% arcilla, 56% limo, 18% arena). En cada uno de los sitios, se efectuó un muestreo compuesto de nueve sub-muestras, cada una de ellas fue colectada en superficie (0-0,15 m), luego de la remoción de la capa superior de restos vegetales. Las sub-muestras se mezclaron e integraron, formando una única “muestra compuesta” proveniente de cada uno de los sitios de muestreo.

El biochar fue elaborado a partir de excretas de codorniz (obtenidas de criaderos supervisados por la FCEfyN-UNC, Córdoba, Argentina). La materia prima fue secada al aire libre y posteriormente pirolizada en horno en un ambiente reducido en oxígeno y suplementado con corriente de N de acuerdo con la metodología de Ameloot *et al.* (2015). Brevemente, la temperatura de calentamiento fue incrementada a razón de 4°C por minuto hasta llegar a 500°C donde se mantuvo por media hora. La concentración de C, H, N y O del biochar obtenido fue calculada utilizando un Autoanalizador Elemental PE 2400 Series II C, H, N, S (Perkin Elmer) (**Tabla 1**). Finalmente, el biochar fue triturado y tamizado (2 mm).

El experimento fue llevado a cabo en invernadero en macetas plásticas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. A lo largo del experimento, la humedad de cada una de las macetas se mantuvo en un 70% de la capacidad de campo, mediante riego manual con agua destilada. La temperatura del invernáculo fue de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para cada tratamiento, el peso de la muestra de suelo más la dosis correspondiente de biochar fue de 500 g. El biochar se aplicó en cuatro dosis: sin biochar (control 0%) y con biochar en dosis del 1%, 3% y 10%. De esta manera el ensayo consistió en 12 tratamientos: SP0%, SP1%, SP3%, SP10%, MS0%, MS1%, MS3%, MS10%, LI0%, LI1%, LI3%, LI10%. Todos los tratamientos fueron repetidos por triplicado durante 22 semanas. Luego, se tomaron sub-muestras de 150 gramos de cada una de las macetas y se almacenaron en condiciones apropiadas.

**Tabla 1.** Características químicas del biochar avícola.

**Table 1.** Chemical characteristics of the poultry biochar.

Propiedad	Biochar avícola
pH	9.67
Conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ )	3.99
C (%)	33.25
H (%)	0.81
O (%)	13.43
N (%)	3.10
$\text{Ca}^+$ ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	32.50
$\text{Mg}^+$ ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	6.10
$\text{Na}^+$ ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	19.80
$\text{K}^+$ ( $\text{mg Kg}^{-1}$ )	57.60
Capacidad de intercambio catiónico	116.0
O:C	0.40
H:C	0.024

## VARIABLES ANALIZADAS Propiedades químicas

El pH y la conductividad eléctrica (CE), en muestras de suelo y biochar, se determinaron con un equipo Hanna HI8314. La relación suelo/biochar: solución extractora fue 1:2,5 para el pH y de 1:5 para la CE según protocolo establecido por Norma IRAM 2009. El C orgánico y el N total/disponible en muestras de suelo fueron determinados por la oxidación del dicromato (Mebius, 1960) y por procesamiento con un autoanalizador Smart Chem 200 (Westco, Scientific Instruments, Inc.), respectivamente.

La concentración de C, H, N y O en las muestras de biochar fue estimada utilizando un Autoanalizador Elemental PE 2400 Series II C, H, N, S (Perkin Elmer). Los cationes intercambiables, calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) fueron determinados mediante titulometría EDTA, mientras que el potasio ( $\text{K}^+$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ) por fotometría de llama (Jackson ML., 1973). La capacidad de intercambio catiónico fue estimada a partir de la sumatoria de todos los cationes intercambiables.

## Actividades enzimáticas

La actividad microbiana total fue estimada mediante hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) según el protocolo de Adam & Duncan (2001). En un tubo para centrífuga se colocaron

2 g de suelo y se agregaron 15 mL de buffer fosfato pH 7,6, 0,2 mL de solución stock de FDA, se tapó y agitó en vortex. Se incubó a 30°C durante 30 min en un baño termostático. Se añadieron 15 mL de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) para detener la reacción y se agitó en vortex durante 5 min. Se dejó reposar y se midió en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 25) a 490 nm.

La actividad deshidrogenasa (DHA) fue determinada por la técnica citada por García *et al.* (1997), se expuso 1 g de suelo (60% de su capacidad de campo) a 0,2 mL de una solución INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-cloruro de feniltetrazolio) al 0,4% durante 24 horas a 28°C en oscuridad. El INTF formado (iodo-nitrotetrazolioformazan) fue extraído con 10 mL de metanol mediante agitación rápida durante 1 min, y posteriormente filtrado con papel Whatman N°5. El INTF fue medido en espectrofotómetro (UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25) a 485 nm.

La actividad extracelular de enzimas específicas del ciclo del carbono fue medida utilizando sustratos fluorogénicamente marcados según la técnica de Stemmer (2004). Se utilizaron dos sustratos derivados de 4-Metilumbelliferona (MUF): MUF-b-d-glucopyranoside para la enzima b-D-glucosidasa y MUF-b-D-xyloside para la b-D-xylosidasa. 20 mg de suelo fresco fueron mezclados con 200  $\mu$ L del buffer-mezcla de sustratos e incubados a 28°C durante 60 min. La separación tuvo lugar en una columna C-18 (HP-Hypersil, 25 cm de largo, 4 mm de diámetro, tamaño de partículas 5 mm), con una velocidad de caudal de 0,8 mL min<sup>-1</sup> y horno a 40°C. Los sustratos no hidrolizados y derivados de 4-MUF fueron detectados con un detector UV a 320 nm.

La estructura de las comunidades microbianas del suelo se determinó por perfiles de fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA) (Bossio *et al.*, 1998). Los lípidos del suelo fueron separados en orden creciente de polaridad mediante una cromatografía en columna rellena con 0,5 g de ácido silícico (100-200 Mesh, Sigma St Louis, MO). Los ácidos grasos metil esterificados fueron inyectados en un cromatógrafo gaseoso (Perkin-Elmer Clarus 600) equipado con una columna Elite-5 (Crossbond 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano),

detector de llama (FID) y detector de masa (MS). La cuantificación se realizó mediante el agregado de un estándar interno (19:0). Los ácidos grasos fueron identificados mediante una corrida previa de un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos (BacterialAcidMethylEsters mix, Supelco, Bellefonte, PA).

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Infostat versión 2018p (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), con un análisis de varianza (ANAVA) a dos vías, con dosis de biochar e intensidad de uso como factores principales, y LSD como test a posteriori ( $p \leq 0.05$ ). Los PLFA individuales, PLFA total, relación bacterias/hongos y bacterias Gram negativas / Gram positivas desde las diferentes intensidades de uso fueron sujetos a un análisis de componentes principales (ACP) para dilucidar los patrones de variación. Correlaciones de Pearson se utilizaron para evaluar la relación entre las propiedades químicas del suelo y sus variables microbiológicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Propiedades químicas

Los resultados muestran que la aplicación de biochar avícola modificó las propiedades químicas y microbiológicas de las muestras de suelo con diferente grado de degradación edáfica.

Los valores de pH aumentaron en proporción directa con la dosis de biochar aplicada (**Tabla 2**). En todos los casos, los valores más bajos de pH se registraron con las dosis menores de biochar y los valores más altos de pH se evidenciaron con las dosis más altas de biochar. Los valores menores de conductividad eléctrica (CE) para una misma dosis de biochar fueron registrados en el tratamiento con mayor intensidad de uso (LI). Los valores de CE aumentaron significativamente con el incremento de la cantidad de biochar. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Liang *et al.*, 2014), quienes registraron aumentos del 60% y 370% para el pH y la CE respectivamente, con el agregado de 3% de biochar avícola a un suelo tropical. En este sentido, Peng *et al.* (2011) observaron que el efecto del biochar

sobre el pH del suelo se encuentra fuertemente ligado a algunos parámetros de elaboración tales como la temperatura y duración de la pirólisis.

El contenido de carbono orgánico total (COT) aumentó en los tratamientos MS y LI luego de la aplicación de biochar (**Tabla 2**). Aunque para el nitrógeno total (NT) se observó una tendencia similar, el aumento no fue significativo. En general, el incremento de COT y de la relación C/N estuvo asociado con el incremento en la dosis de biochar. El aumento de C orgánico en suelos enmendados por biochar, podría explicarse principalmente por dos mecanismos: por un lado, el biochar es en sí mismo una fuente de C, la presencia de C en estructuras aromáticas le confiere una naturaleza recalcitrante (Purakayastha *et al.* 2019; Quambrani *et al.* 2017) y, por otro lado, existe evidencia que indica que el biochar inhibe la mineralización del C orgánico en el suelo,

contribuyendo de esta manera a su acumulación (Prayogo *et al.*, 2014).

Los valores de NT no cambiaron significativamente cuando se aplicó biochar. Mientras que la concentración de N asimilable disminuyó de manera proporcional a la dosis de biochar aplicada, principalmente en MS y LI. La reducción en la acumulación de N asimilable en suelos enmendados con biochar podría deberse al efecto directo del biochar sobre bacterias arqueas que participan en proceso de nitrificación y/o a la inmovilización del N mediante su incorporación a la biomasa microbiana (Jones *et al.*, 2012).

### Actividad enzimática

La actividad hidrolizante de FDA varió según la intensidad de uso y la dosis de biochar aplicada, con una interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 3**). La mayor actividad

**Tabla 2.** Propiedades químicas del suelo debida a diferentes intensidades de uso, dosis de biochar y su interacción.

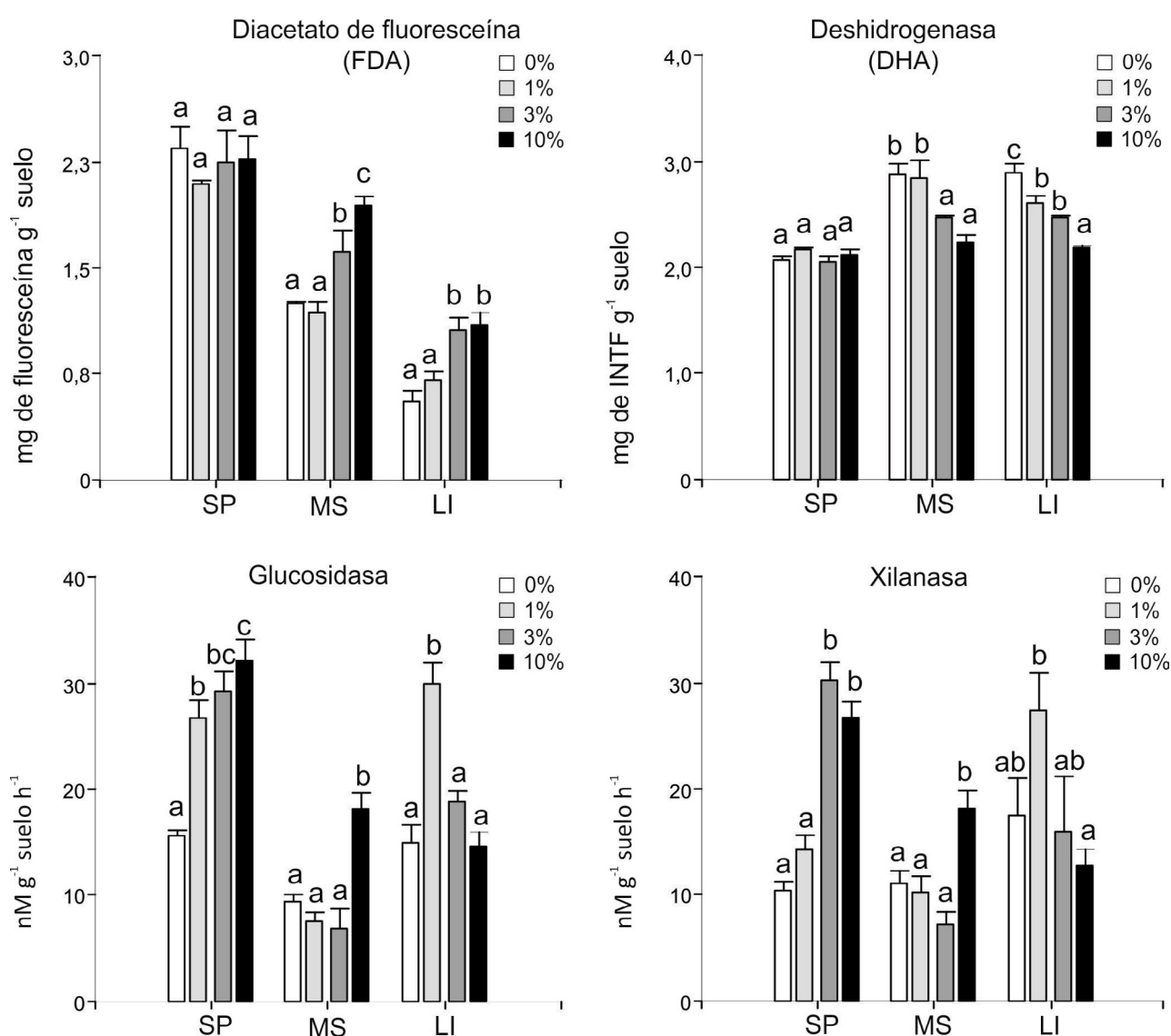
**Table 2.** Soil chemical properties due to different land-use intensity, biochar rates and their interaction.

Deterioro Edáfico	Dosis	pH	CE (dS m <sup>-1</sup> )	COT (g Kg <sup>-1</sup> )	N total (g Kg <sup>-1</sup> )	N Asimil. (mg Kg <sup>-1</sup> )	C/N
SP	0%	6.74	0.52	39.20	3.70	824.63	10.59
	1%	6.94	0.78	40.89	3.84	777.58	10.65
	3%	7.13	1.19	39.41	3.73	666.14	10.58
	10%	7.81	2.53	39.37	3.67	430.39	10.73
MS	0%	6.37	0.33	22.62	2.08	625.78	10.88
	1%	7.01	0.58	23.75	2.18	565.85	10.90
	3%	7.47	1.13	25.31	2.13	435.84	11.96
	10%	8.51	2.74	30.06	2.32	149.94	13.02
LI	0%	5.85	0.21	21.14	1.92	428.41	11.01
	1%	6.75	0.44	21.19	1.92	350.41	11.06
	3%	7.38	0.82	23.48	1.99	238.72	11.83
	10%	8.38	2.06	25.97	2.08	54.60	12.52
ANOVA							
Deterioro F		49.21	80.35	2090	1111	59.22	40.56
Deterioro P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Dosis F		1419	1324	60.18	2.36	35.75	31.35
Dosis P		<0.001	<0.001	<0.001	0.097	<0.001	<0.001
Deterioro x Dosis F		77.70	9.15	22.87	2.06	0.29	7.46
Deterioro x Dosis P		<0.001	<0.001	<0.001	0.095	0.935	<0.001

SP: suelo prístino forestal, MS: suelo agrícola bajo manejo sustentable, LI: suelo agrícola bajo laboreo intenso, CE:conductividad eléctrica, COT: carbono orgánico total, NT: nitrógeno total.

hidrolizante FDA se observó en SP, seguida por MS y finalmente en LI ( $p < 0,05$ ), coincidente con otros estudios que demuestran una correlación significativa y positiva entre el contenido de MO y su actividad FDA (Li *et al.*, 2016). En concordancia, el análisis de correlación de Pearson entre el FDA y las propiedades químicas CE, COT, NT y N asimilable mostraron una correlación positiva ( $r = 0.43, 0.89, 0.85, 0.44, p < 0.05$ , respectivamente). En los últimos años, diversos autores han estudiado el impacto de diferentes dosis de biochar sobre la actividad

enzimática de suelos agrícolas (Li *et al.*, 2017; Abujabhah *et al.*, 2016; Bhaduri *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los valores de actividad hidrolizante FDA en MS y LI registraron un incremento significativo al aplicar las dosis más altas de biochar (3 y 10%) (**Figura 1**). Sin embargo, en SP no se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis de biochar. Este resultado sugiere que la aplicación de biochar es capaz de incrementar la actividad microbiana total, principalmente en suelos con mayor grado de deterioro edáfico.



**Figura 1.** Actividad enzimática de suelos tratados con diferentes dosis de biochar en un gradiente de intensidad de uso. Letras diferentes indican diferencias significativas entre dosis de biochar dentro de cada intensidad de uso ( $p < 0.05$ ). SP: suelo prístino forestal, MS: suelo agrícola bajo manejo sustentable, LI: suelo agrícola bajo laboreo intenso.

**Figure 1.** Enzymatic activities of soils treated with different rates of biochar along a land-use intensity gradient. Different letters indicate significant differences between biochar rates within each land-use intensity ( $p < 0.05$ ). SP: pristine forest soil, MS: agricultural soil, sustainable management LI: agricultural soil under conventional tillage

Las actividades  $\beta$ -glucosidasa y xilanasas fueron modificadas significativamente por la intensidad de uso y la dosis de biochar. Los valores máximos de actividad para ambas enzimas fueron registrados en SP, en los tratamientos con las dosis más altas de biochar (3 y 10%). La  $\beta$ -glucosidasa y la xilanasas son dos enzimas clave involucradas en el ciclado de C, y los aumentos en los contenidos de ellas con altas dosis de biochar podrían deberse a incrementos en la fracción lábil de C, ya que los residuos pirolizados sobre la superficie del biochar contribuyen a aumentar la fracción lábil de C, y consecuentemente, pueden ser utilizados como sustrato microbiano (Simarani *et al.*, 2018). La actividad  $\beta$ -glucosidasa mostró una correlación positiva con el contenido de COT y NT ( $r=0.53, 0.54, p<0.001$ ). Otra posible explicación del incremento de estas enzimas podría estar relacionado con un cambio en la diversidad funcional hacia un efecto “priming” como consecuencia de la incorporación de biochar. Bajas dosis de biochar (1%) aplicadas en LI incrementaron significativamente la actividad  $\beta$ -glucosidasa y xilanasas (**Figura 1**). Sin embargo, las actividades de dichas enzimas en LI no fueron afectadas por altas dosis de biochar (3% y 10%), y los valores más bajos de actividad fueron registrados en los suelos tratados con las dosis más altas. La disminución de actividad enzimática como consecuencia de la aplicación de altas dosis de biochar ha sido reportada por varios autores (Demisie *et al.*, 2016; Oleszczuk *et al.*, 2014) y podría estar asociada con mecanismos de sorción (Foster *et al.*, 2018).

La actividad DHA fue significativamente por la intensidad de uso y la dosis de biochar, con interacción significativa entre ambos factores (**Tabla 3, Figura 1**). La aplicación de altas dosis de biochar produjo una marcada disminución de la actividad DHA en ambos suelos bajo uso agrícola (MS y LI). Los menores valores de actividad DHA en los suelos agrícolas fueron observados en las dosis más elevadas de biochar, mientras que los más bajos fueron registrados en los suelos sin enmendar (**Figura 1**). Una causa probable de esta disminución podría estar relacionada con el cambio en el pH del suelo y/o con el aporte de C recalcitrante ocasionado por el agregado de biochar (Mariela *et al.*, 2016). Así, la actividad DHA de nuestro estudio mostró una correlación negativa con pH, CE, COT y NT ( $r=-0.56, -0.56, -0.80, -0.71, p<0.05$ ). En este sentido, Benavente *et al.* (2018) sugirieron que el efecto depresor de la actividad DHA observado en suelos tratados con biochar podría deberse a una menor proporción de C lábil y/o a la reducción de nutrientes disponibles.

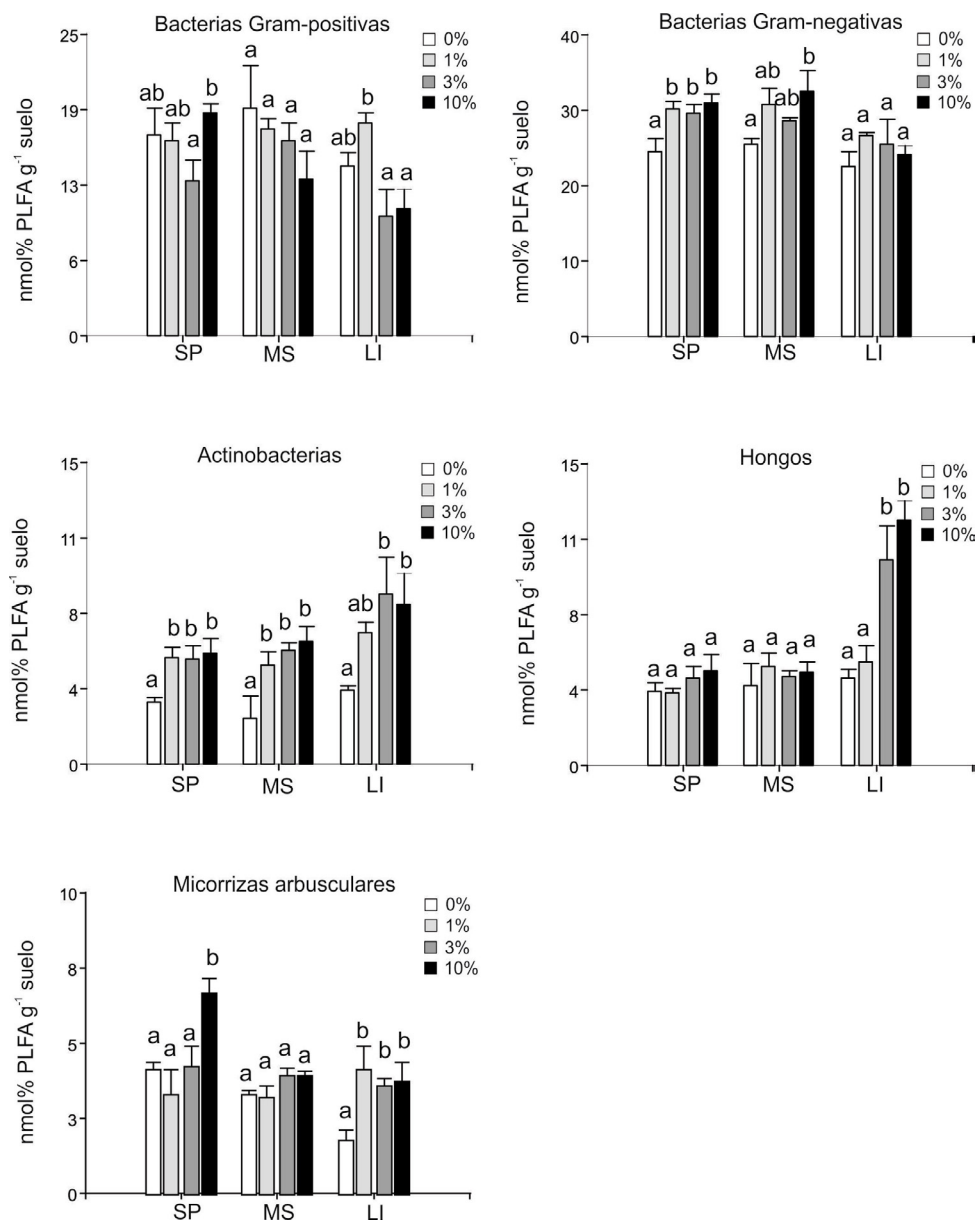
### Biomasa microbiana y estructura de las comunidades

La aplicación de biochar avícola alteró la estructura de las comunidades bacterianas. El análisis de CP explicó 69% de la variación total (CP1 43% y CP2 26%) (**Figura 2**). En general, las dosis más altas de biochar se localizaron en el primero y segundo cuadrante, mientras que las dosis más bajas lo hicieron en el tercero y cuarto cuadrante.

**Tabla 3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad enzimática debida a diferente intensidad de uso del suelo, dosis de biochar y su interacción.

**Table 3.** Analysis of variance (ANOVA) for the enzymatic activity due to different land-use intensity, biochar rates and their interaction.

	Unidad	Fuente de variación					
		Dosis de biochar (B)		Deterioro edáfico (E)		Interacción B x E	
		F	P	F	P	F	P
Fluorescein diacetato (FDA)	$\mu\text{g g}^{-1}$	10.02	<0.001	144.89	<0.001	2.78	0.033
Dehidrogenasa (DHA)	$\mu\text{g g}^{-1}$	22.96	<0.001	57.97	<0.001	6.46	<0.001
Glucosidasa	$\text{nM g}^{-1} \text{h}^{-1}$	19.36	<0.001	104.28	<0.001	18.38	<0.001
Xilasa	$\text{nM g}^{-1} \text{h}^{-1}$	3.67	0.026	14.27	<0.001	11.17	<0.001



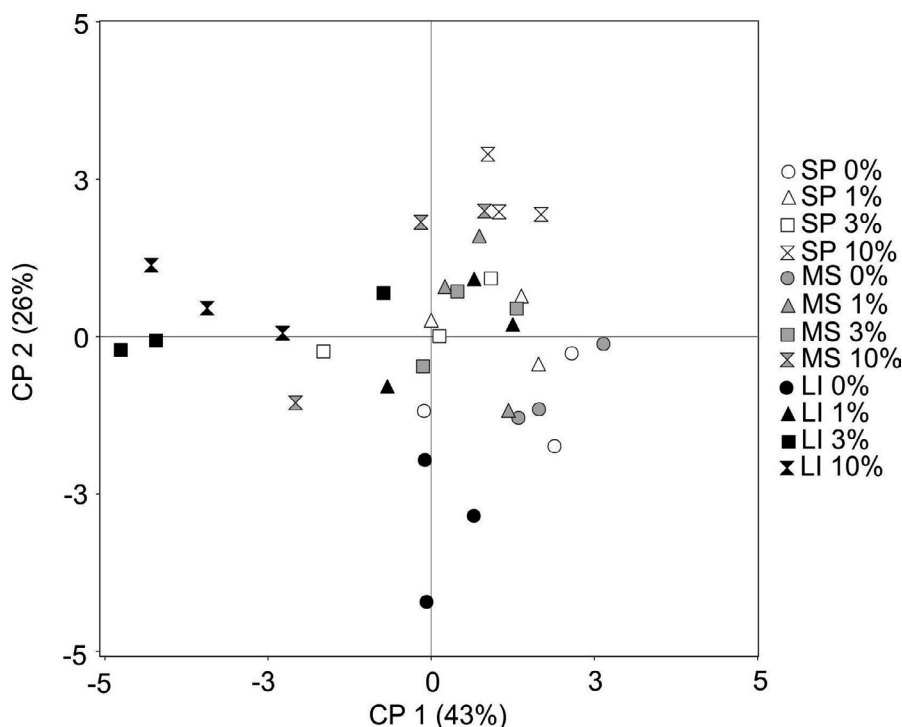
**Figura 2.** Análisis de componentes principales de perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos en suelos tratados con diferentes dosis de biochar en un gradiente de intensidad de uso. SP: suelo prístino forestal, MS: suelo agrícola bajo manejo sustentable, LI: suelo agrícola bajo laboreo intenso.

**Figure 2.** Principal component analysis of phospholipid fatty acid (PLFA) profiles as influenced by the application of different rates of biochar along a land use intensity gradient. SP: pristine forest soil, MS: agricultural soil under sustainable management, LI: agricultural soil under conventional tillage.

No se encontró una separación clara entre intensidades de uso. Las mayores poblaciones de actinobacterias fueron registradas en los suelos bajo alta intensidad de uso (LI). Además, la aplicación de biochar incrementó la población de actinobacterias, en forma independiente de la intensidad de uso y dosis utilizada (**Figura 3**). De manera similar, altas poblaciones de actinobacterias fueron reportadas por Khodadad *et al.* (2011) luego de la

incorporación de biochar de leña y de gramíneas en suelo forestal. Las poblaciones de actinobacterias examinadas en nuestro trabajo mostraron una correlación positiva con pH, CE, y relación C/N ( $r=0.53$ ,  $0.35$ ,  $0.49$ ,  $p<0.05$ , respectivamente) y negativa con el N asimilable ( $r=-0.54$ ,  $p<0.001$ ), sugiriendo que estos microorganismos fueron altamente sensibles a cambios en las propiedades químico-edáficas.





**Figura 3.** Estructura de las comunidades microbianas de suelos tratados con diferentes dosis de biochar en un gradiente de intensidad de uso. Letras diferentes indican diferencias significativas entre dosis de biochar dentro de cada intensidad de uso ( $p < 0.05$ ). SP: suelo prístino forestal, MS: suelo agrícola bajo manejo sustentable, LI: suelo agrícola bajo laboreo intenso.

**Figure 3.** Microbial community structure of soils treated with different biochar rates along a land use intensity gradient. Different letters indicate significant differences between biochar rates within each land-use intensity ( $p < 0.05$ ). SP: pristine forest soil, MS: agricultural soil under sustainable management LI: agricultural soil under conventional tillage.

Las bacterias Gram-negativas también fueron afectadas según la intensidad de uso y la dosis de biochar, con una interacción no significativa entre ambos factores (Tabla 4, Figura 3). Excepto para LI, la aplicación de biochar tendió a incrementar la abundancia de bacterias Gram-negativas en comparación con el tratamiento sin biochar. Este resultado sugiere que la aplicación de biochar puede incrementar las bacterias Gram-negativas, preferentemente en suelos con baja in-

tensidad de uso. De manera similar, otros estudios demuestran que el C derivado de biochar puede ser utilizado para el crecimiento de microorganismos. Por ejemplo, Steinbeiss *et al.* (2009) reportaron asimilación de C de biochar para la formación de PLFAs de bacterias Gram-negativas. En contraste, las bacterias Gram-positivas fueron levemente afectadas por la dosis de biochar y la intensidad de uso. Nuestro estudio también encontró un mayor efecto de la aplicación del biochar sobre

**Tabla 4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la estructura de las comunidades microbianas del suelo debida a diferentes intensidades de uso del suelo, dosis de biochar y su interacción.

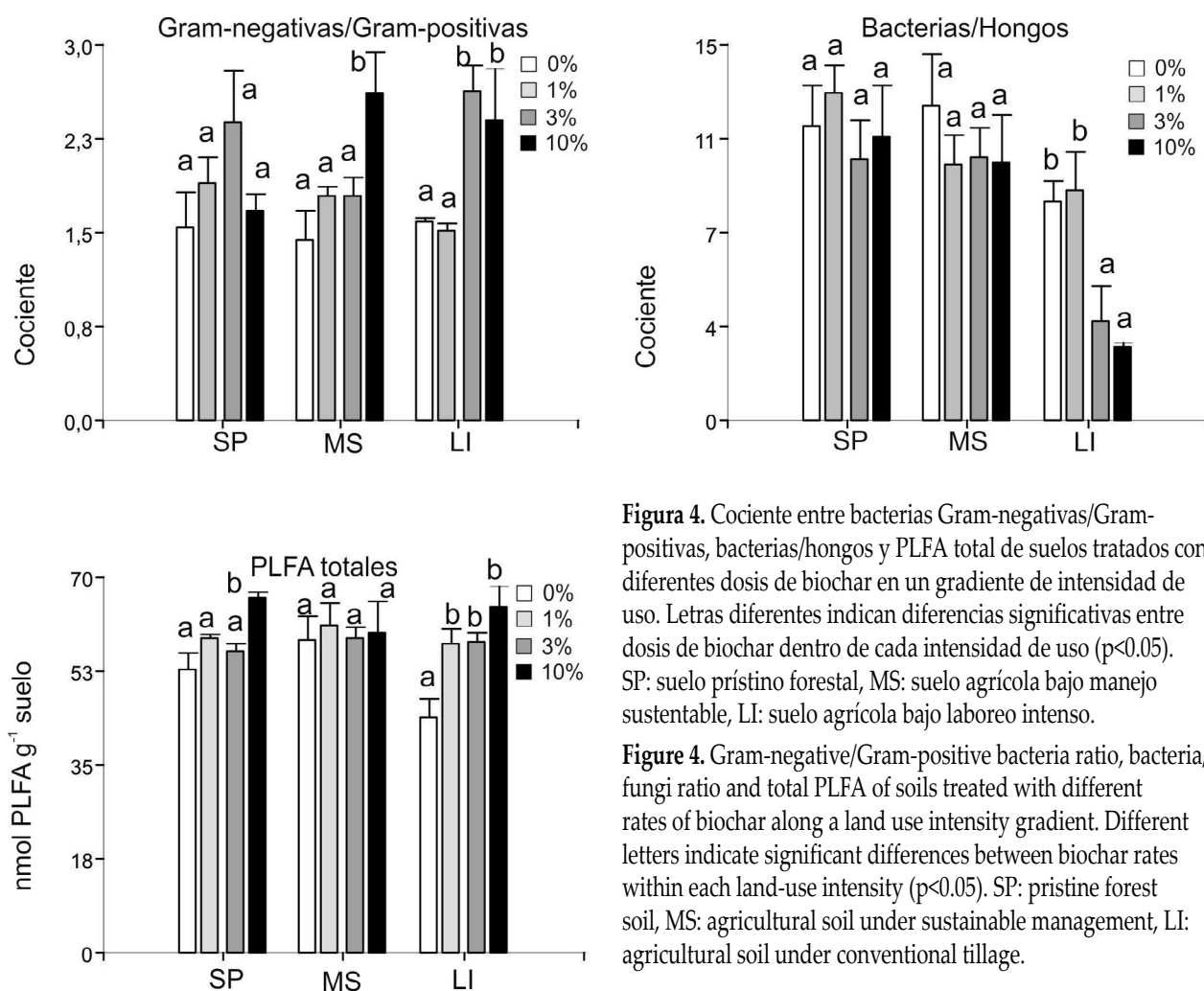
**Table 4.** Analysis of variance (ANOVA) for microbial community structure due to different land-use intensity, biochar rates and their interaction.

Unidad		Fuente de variación					
		Dosis de biochar (B)		Deterioro edáfico (E)		Interacción B x E	
		F	P	F	P	F	P
Bacterias GP	nmol% g <sup>-1</sup>	3.25	0.039	3.74	0.038	1.89	0.124
Bacterias GN	nmol% g <sup>-1</sup>	5.83	0.003	8.77	0.001	0.64	0.696
Hongos	nmol% g <sup>-1</sup>	10.17	<0.001	27.68	<0.001	6.43	<0.001
Actinobacterias	nmol% g <sup>-1</sup>	9.73	<0.001	5.87	0.008	0.46	0.833
Hongos micorrízicos arbusculares	nmol% g <sup>-1</sup>	6.71	0.002	7.39	0.003	3.74	0.009
GP/GN		7.12	0.001	0.46	0.635	2.58	0.045
Bact/Hongos		3.28	0.038	15.73	<0.001	1.26	0.311
PLFA total	nmol.g <sup>-1</sup>	6.52	0.002	1.18	0.326	1.74	0.155

las bacterias Gram-negativas en comparación con las Gram-positivas. Así, en MS y LI se detectó un aumento del cociente bacterias Gram-negativas/Gram-positivas, principalmente en la dosis más alta de biochar (10%) (**Figura 4**). Algunos estudios previos indicaron que la aplicación de biochar es capaz de estimular el crecimiento de algunos taxones específicos de microorganismos. Por ejemplo, Watzinger *et al.* (2014) reportaron poco efecto de biochar de cáscaras de trigo sobre la población de bacterias Gram-positivas, mientras que las bacterias Gram-negativas y las actinobacterias fueron significativamente incrementadas. Las bacterias Gram-negativas mostraron una correlación positiva con pH, CE y COT ( $r=0.38, 0.41, 0.34, p<0.05$ , respectivamente).

Se registraron cambios en las poblaciones de hongos micorrícicos arbusculares, ya que en general la aplicación de altas dosis de biochar produjeron incrementos en dichas poblaciones

microbianas (**Figura 3**). Además, las poblaciones de hongos micorrícicos arbusculares mostraron una correlación positiva con pH, CE, COT y NT ( $r=0.45, 0.53, 0.45, 0.41, p<0.05$ , respectivamente). La aplicación de biochar (3% y 10%) incrementó las poblaciones de hongos saprofitos sólo en LI, sugiriendo que la abundancia de hongos resulta más afectada en suelos con mayor intensidad de uso. Las dosis más altas de biochar (3% y 10%) produjeron una disminución de la relación bacterias/hongos (**Figura 4**), probablemente causado por el incremento de biomasa fúngica en dichos tratamientos. En este sentido, diferentes autores han reportado que el cociente bacterias/hongos puede modificarse como consecuencia de cambios en el pH del suelo. Así, un incremento en el pH del suelo usualmente produce un incremento en la biomasa bacteriana y una disminución (o desafección) de la biomasa fúngica (Rousk *et al.*, 2010). Esta tendencia resulta



**Figura 4.** Cociente entre bacterias Gram-negativas/Gram-positivas, bacterias/hongos y PLFA total de suelos tratados con diferentes dosis de biochar en un gradiente de intensidad de uso. Letras diferentes indican diferencias significativas entre dosis de biochar dentro de cada intensidad de uso ( $p<0.05$ ). SP: suelo prístino forestal, MS: suelo agrícola bajo manejo sustentable, LI: suelo agrícola bajo laboreo intenso.

**Figure 4.** Gram-negative/Gram-positive bacteria ratio, bacteria/fungi ratio and total PLFA of soils treated with different rates of biochar along a land use intensity gradient. Different letters indicate significant differences between biochar rates within each land-use intensity ( $p<0.05$ ). SP: pristine forest soil, MS: agricultural soil under sustainable management, LI: agricultural soil under conventional tillage.

opuesta a la encontrada en el presente trabajo. El agregado de biochar produjo un incremento en el pH del ambiente edáfico y, sin embargo, se registró una disminución del cociente bacterias/hongos. Así, la disminución de la relación bacterias/hongos registrada en nuestro estudio podría deberse al efecto beneficioso del biochar sobre las poblaciones fúngicas. En concordancia con nuestro trabajo, diferentes autores han reportado que el agregado de biochar puede causar un incremento de las poblaciones fúngicas, principalmente asociado a la exploración y colonización de los poros del material pirolizado (Jaafar *et al.*, 2014).

Es ampliamente conocido que los PLFA totales son indicadores sensibles de la biomasa microbiana total (Wixon & Balsler, 2013). Nuestro estudio también detectó incrementos significativos de PLFA total luego de la aplicación de biochar en los tratamientos SP y LI (**Tabla 4, Figura 4**). Además, la biomasa total estimada por perfiles de PLFA mostró correlación positiva con el pH y la CE ( $r=0.56$ ,  $.047$ ,  $p<0.001$ , respectivamente), resaltando la importancia de estas variables en la construcción de biomasa microbiana. El incremento en la biomasa microbiana observada en suelos tratados con biochar puede ser principalmente atribuido a una mejora en las propiedades físico-químicas del suelo, al aumento de los niveles de C disponible, agua y nutrientes y/o al incremento en la protección de microorganismos frente a sus predadores (Chen *et al.*, 2017). Se ha propuesto que los poros contenidos en el biochar a lo largo de todo su volumen, pueden servir de hábitat y refugio para los microorganismos (Zhu *et al.*, 2017). En efecto el biochar proporciona un volumen de poros habitables por unidad de partícula, mayor que el del suelo (Quilliam *et al.* 2013).

## CONCLUSIONES

La aplicación de biochar avícola, principalmente en dosis alta, reduce la acidez del suelo evaluado (Haplustol típico) e incrementa el contenido de COT. También aumenta la actividad microbiana total y la actividad glucosidasa; decrece la actividad DHA.

La presencia de biochar en los suelos agrícolas evaluados modifica la comunidad microbiana por el aumento de la densidad de algunos taxones microbianos, como actinobacterias y hongos micorrízicos.

La aplicación de biochar produce importantes incrementos de la biomasa microbiana, principalmente en suelos con uso agrícola intensivo. La aplicación de biochar es de mayor utilidad en suelos con alto grado de degradación edáfica.

## CONSIDERACIONES

Estudios futuros deberán contemplar la incorporación de biochar avícola en experimentos de mayor escala y/o ensayos a campo que contemplen efectos en el suelo y en los cultivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abujabhah, IS; R Doyle; SA Bound & JP Bowman. 2016. The effect of biochar loading rates on soil fertility, soil biomass, potential nitrification, and soil community metabolic profiles in three different soils. *J Soil Sediments*16(9): 2211-2222.
- Adam, G & H Duncan. 2001. Development of a sensitive and rapid method for measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Ameloot, N; S Sleutel; KC Das; J Kanagaratnam & S De Neve. 2015. Biochar amendment to soils with contrasting organic matter level: effects on N mineralization and biological soil properties. *Bioenergy* 7: 135-144.
- Andrade, F; M Taboada; D Lema; N Maceira; H Echeverría; G Posse; D Prieto; E Sánchez; D Ducasse; M Bogliani; JC Gamundi; E Trumper; J Frana; E Perotti; F Fava & M Mastrángelo. (Eds) 2017. Los desafíos de la agricultura argentina. Satisfacer las futuras demandas y reducir el impacto ambiental. INTA Ediciones. Argentina. 124 pp.
- Benavente, I; G Gascó; C Plaza; J Paz-Ferreiro & A Méndez. 2018. Choice of pyrolysis parameters for urban wastes affects soil enzymes and plant germination in a Mediterranean soil. *Sci. Total Environ.*634: 1308-1314.
- Bossio, D; KN Scow & K Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* 36: 1-12.
- Campitelli, P; A Aoki; O Gudelj; A Rubenacker & R Sereno. 2010. Soil quality indicators of the effects of land-use and agricultural practices in a pilot area of the central region of Córdoba. *Ciencia del Suelo* 28(2): 223-231.

- Chan, KY & Z Xu. 2009. Biochar: nutrient properties and their enhancement. *Biochar for environmental management: Sci. Technol. Earth Scan*, London, pp. 67-84.
- Chen, J; S Li; C Liang; Q Xu; Y Li; H Qin & JJ Fuhrmann. 2017. Response of microbial community structure and function to short-term biochar amendment in an intensively managed bamboo (*Phyllostachys praecox*) plantation soil: Effect of particle size and addition rate. *Sci. Total Environ.* 574: 24-33.
- D Prieto, E Sánchez, D Ducasse, M Bogliani; JC Gamundi; E Trumper; J Frana; E Perotti; F Fava y M Mastrángelo. 2017. *En Los desafíos de La agricultura Argentina. INTA Ediciones.*
- Demisie W; ZY Liu & MK Zhang (2014) Effect of biochar on carbon fractions and enzyme activity of red soil. *Catena* 121:214-221
- Ducey, TF; JA Ippolito; KB Cantrell; JM Novak & RD Lentz. 2013. Addition of activated switchgrass biochar to an aridic subsoil increases microbial nitrogen cycling gene abundances. *Appl. Soil Ecol.* 65: 65-72.
- Foster, E; EJ Fogle & MF Cotrufo. 2018. Sorption to biochar impacts  $\alpha$ -glucosidase and phosphatase enzyme activities. *Agriculture Switzerland* 8(150): 1-12.
- García, C; T Hernandez & F Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun. Soil Sci. Plan.* 28: 123-134.
- Jaafar, NM; PL Clode & LK Abbott. 2014. Microscopy observations of habitable space in biochar for colonization by fungal hyphae from soil. *J. Integr. Agric.* 13: 483-490.
- Jackson ML. 1973. *Soil Chemical analysis.* Prentice Hall, India New Delli.
- Jones, DL; J Rousk; G Edwards-Jones; TH De Luca and DV Murphy. 2012. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three-year field trial. *Soil Biol. Biochem.* 45: 113-124.
- Khodadad, CLM; AR Zimmerman; SJ Green; S Uthandi & JS Foster. 2011. Taxa specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biol. Biochem.* 43: 385-392.
- Li, M; H Nie; S Zhang; F Zhou; D Han; L Zhan; Y Tian; M Shi & E Zhang. 2016. Correlation between FDA enzyme activity and soil fertility under combining application organic and nitrogen fertilizer in facility vegetable field. *Acta Horticulturae Sinica* 43(5): 907-917.
- Li, S; C Liang & Z Shangguan. 2017. Effects of apple branch biochar on soil C mineralization and nutrient cycling under two levels of N. *Sci. Total Environ.* 607 – 608: 109 – 119.
- Liang, C; X Zhu; S Fu; A Méndez; G Gascó & J Paz-Ferreiro. 2014. Biochar alters the resistance and resilience to drought in a tropical soil. *Environ. Res. Lett.* 9(6): 064013.
- Mariela, F; MEI Pável; SRL Manuel; FGM Jesús & L Reyes. 2016. Dehydrogenase and mycorrhizal colonization: Tools for monitoring agrosystem soil quality. *Appl. Soil Ecol.* 100: 144-153.
- Oleszczuk P; L Jońko; B Futa; S Pasieczna-Patkowska; E Pays & P Kraska. 2014. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. *Geoderma* 214: 10 – 18.
- Peng, X; LL Ye; CH Wang; H Zhou & B Sun B. 2011. Temperature and duration dependent rice straw-derived biochar: characteristics and its effects on soil properties of an Ultisol in southern China. *Soil Till. Res.* 112: 159–166.
- Prayogo, C; JE Jones; J Baeyens & GD Bending. 2014. Impact of biochar on mineralization of C and N from soil and willow litter and its relationship with microbial community biomass and structure. *Biol. Fert. Soils* 50(4): 695-702.
- Purakayastha, TJ; T Bera; Debarati Bhaduri; Binoy Sarkar; Sanchita Mandal; Peter Wade; Savita Kumari; Sunanda Biswas; Manoj Menon; Pathak, H; DCW Tsang, 2017. A review on biochar modulated soil condition improvements and nutrient dynamics concerning crop yields: Pathways to climate change mitigation and global food security. *Chemosphere.* 227: 345 – 365.
- Rousk, J; E Bååth; PC Brookes; CL Lauber; C Lozupone; JG Caporaso; R Knight & N Fierer. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4: 1340-1351.
- Sadeghi, SH; GP Mohammad Hossein; Younesi H & Kheirfam H. 2018. Ameliorating some quality properties of an erosion-prone soil using biochar produced from dairy waste water sludge. *Catena.* 171: 193 – 198.
- Simarani, K; MF Azlan Halmi & R Abdullah. 2018. Short-term effects of biochar amendment on soil microbial community in humid tropics. *Arch. Agron. Soil Sci.* 64(13): 1847-1860.
- Steinbeiss, S; G Gleixner & M Antonietti. 2009. Effect of biochar amendment on soil carbon balance and soil microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* 41:1301-1310.
- Stemmer, M. 2004. Multiple-substrate enzyme assays: a useful approach for profiling enzyme activity in soils? *Soil Biol. Biochem.* 36: 519-527.
- Tian, J; J Wang; M Dippold; Y Gao; E Blagodatskaya & Y Kuzyakov. 2016. Biochar affects soil organic matter cycling and microbial functions but does not alter microbial community structure in a paddy soil. *Sci. Total Environ.* 556: 89-97.

- Ulyett, J; R Sakrabani; M Kibblewhite & M Hann. 2014. Impact of biochar addition on water retention, nitrification and carbon dioxide evolution from two sandy loam soils. *Eur. J. Soil Sci.* 65: 96-104.
- Watzinger, A; S Feichtmair; B Kitzler; F Zehetner; S Kloss; B Wimmer; S Zechmeister-Boltenstern and G Soja G. 2014. Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized  $^{13}\text{C}$  – labeled biochar as revealed by  $^{13}\text{C}$  PLFA analyses: results from a short term incubation and pot experiment. *Eur. J. Soil Sci.* 65: 40-51.
- Wixon, DL & TC Balsler. 2013. Toward conceptual clarity: PLFA in warmed soils. *Soil Biol. Biochem.* 57: 769-774.
- Yu, H; Zou W; Chene J; Chenf H; Z Yug; J Huangh;,H Tanga; X Weij; B Gaob. 2019. Biochar amendment improves crop production in problem soils: A review. *J Environ Manage.* 232: 8 – 21.
- Zhang, Z; Z Zhu; B Shen & L Liu. 2019. Insights into biochar and hydrochar production and applications: A review. *Energy.* 171: 581 – 598.
- Zhu, X; B Chen; L Zhu & B Xing. 2017. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review. *Environ. Pollut.* 227: 98-115.