

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DEL
PROCESO DE LA NITRIFICACIÓN EN SUELOS ÁCIDOS DE DIEZ MUNICIPIOS
DE COLOMBIA

JOSÉ ALONSO HURTADO PÉREZ
TIRSO ANCISAR MONTENEGRO ROA



UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA AGRONÓMICA

TUNJA

1999

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DEL
PROCESO DE LA NITRIFICACIÓN EN SUELOS ÁCIDOS DE DIEZ MUNICIPIOS
DE COLOMBIA

JOSÉ ALONSO HURTADO PÉREZ
TIRSO ANCISAR MONTENEGRO ROA

Trabajo de tesis presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agrónomo

Directores

FRANZ HANKE
I. A. Ph.D. Química Agrícola
SILVIO E. VITERI
I. A. Ph. D. Microbiología de Suelos

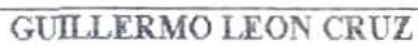


UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÁRIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
TUNJA
1999

Nota de Aceptación



HUGO E. CASTRO
Decano



GUILLERMO LEON CRUZ
Director de Escuela




CARLOS VILLAMIL VELA
Secretario Facultad



JORGE O. BLANCO
Jurado Calificador



PABLO E. CONTRERAS
Jurado Calificador



FRANZ HANKE
Director de tesis



SILVIO E. VITERI
Director de Tesis



JOSE A. HURTADO
Autor



TIRSO A. MONTENEGRO
Autor

A mis padres, Lilia y Luis María por su apoyo incondicional y su empeño incansable por sacar adelante a sus hijos e inculcar en nosotros los valores éticos y morales que rigen nuestras vidas.

A mis hermanas, porque fueron una inspiración que me dio fuerza para seguir adelante en momentos críticos y a veces desesperados cuando desfallecía en el deseo de llevar a buen término este trabajo.

Tirso Ancisar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Franz Hanke I. A. Ph.D. y Silvio Viteri I. A. Ph.D. directores de este trabajo por sus valiosos aportes y orientaciones.

Jorge Blanco Biólogo M. Sc. y Pablo Contreras I. A. M. Sc. Jurados calificadores.

A la empresa MERCK COLOMBIA S. A. que gentilmente suministró las cintas reactivas para el uso del reflectómetro y algunos reactivos para la preparación de los medios de cultivo.

Ingenieros agrónomos: Mauricio Fonseca, René Saenz, Nairo Piña, Edwin Perez, Pedro Mariño, German Colmenares, Milton Cuevas, Yaneth Jimenez, Ana Maria Camen. Ingeniero metalúrgico. Fredy Puentes: Licenciados en Química y Biología: Flor Edith Montenegro y Miguel Ochoa. Todos ellos por su colaboración en la recolección de las muestras de suelos.

Licenciada en Química y Biología. Claudia Mariño. Auxiliares de Laboratorio Emeterio Paipilla, Ricardo Pacheco y Antonio Nuñez por su colaboración en el trabajo de laboratorio y en la consecución de los reactivos necesarios para las pruebas.

Señora Silenia Fajardo, Lucrecia Roa y señor Jaime Alfonso por el apoyo moral.

Un agradecimiento muy especial al señor Marcos Enrique Suarez Fajardo Licenciado en Matemáticas, quien nos brindó una amistad fraternal y puso a nuestra disposición su computador para la elaboración de los libros y todos los documentos necesarios para la ejecución de esta investigación.

A todas las personas que de pensamiento, palabra y obra nos han ayudado, para que DIOS les ilumine, les guíe y les proteja en su camino.

José Aionso

LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de solución buffer y medios de

Cultivo

36

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo del Nitrógeno	24
Figura 2. Distribución de los municipios seleccionados para el muestreo	34
Figura 3. Variación del N-NH ₄ en los suelos sin adición de amonio	48
Figura 4. Variación del N-NO ₃ en los suelos sin adición de amonio	49
Figura 5. Variación del N-NH ₄ en los suelos con adición de amonio	50
Figura 6. Variación del N-NO ₃ en los suelos con adición de amonio	51
Figura 7. Bacterias oxidadoras de amonio encontradas en los suelos.	60
Figura 8. Bacterias oxidadoras de nitrato encontradas en los suelos.	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de los Municipios Muestreados	33
Tabla 2. Prescencia de N-NH ₄ y N-NO ₃ en suelos sin adición de Amonio	52
Tabla 3. Prescencia de N-NH ₄ y N-NO ₃ en suelos con adición de Amonio	52
Tabla 4. Cantidad de N-NH ₄ oxidado e incremento de N-NO ₃ en suelos sin adición de amonio	53
Tabla 5. Cantidad de N-NH ₄ oxidado e incremento de N-NO ₃ en suelos con adición de amonio	53
Tabla 6. Análisis de la materia orgánica de los suelos	54
Tabla 7. Variación del pH de los suelos	55
Tabla 8. Densidad de población de bacterias oxidadoras de amonio	57
Tabla 9. Densidad de población de bacterias oxidadoras de nitrito	57

CONTENIDO

	Pág
RESUMEN	14
SUMMARY	16
ZUSAMMENFASSUNG	18
INTRODUCCION	20
2. REVISION DE LITERATURA	22
2.1 ORIGEN DEL NITROGENO DEL SUELO	22
2.2 CICLO DEL NITRÓGENO	22
2.3 EL PROCESO DE LA NITRIFICACIÓN	25
2.3.1 Definición	25
2.3.2 Reseña Histórica	26
2.3.3 Microorganismos Participantes	27
2.3.4 Bioquímica de la Nitrificación	28
2.3.5 Factores que Afectan la Nitrificación	29
2.3.6 Importancia Práctica de la Nitrificación	30
2.3.7 Nitrificación y Contaminación Ambiental	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33

3.1 MATERIALES	33
3.1.1 Suelos	33
3.1.2 Laboratorio	35
3.1.3 Equipo de Campo	35
3.1.4 Reactivos	35
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Selección de los Municipios	36
3.2.2 Muestreo de Suelos	37
3.2.3 Pruebas de Laboratorio	38
3.2.3.1 Actividad Nitrificante en el Suelo	38
3.2.3.2 Densidad de Población	43
3.2.3.3 Aislamiento de las Bacterias Nitrificantes	46
3.2.3.4 Identificación de los Nitrificantes	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 PRUEBA DE TRANSFORMACIÓN DE AMONIO EN NITRATO	47
4.2 DENSIDAD DE POBLACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES	56
4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES	59
5 CONCLUSIONES	61
6 RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	68

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Preparación de la solución de Tromsdorf	69
Anexo B. Tabla de Mac Crady para cinco tubos por dilución para enumeración de bacterias	70
Anexo C. Datos de laboratorio para valoración de N-NH ₄ en suelos sin adición de amonio	71
Anexo D. Datos de laboratorio para valoración de N-NH ₄ en suelos con adición de amonio	72
Anexo E. Datos de laboratorio para valoración de N-NO ₃ en suelos sin adición de amonio	73
Anexo F. Datos de laboratorio para valoración de N-NO ₃ en suelos con adición de amonio	74
Anexo G. Tubos positivos de oxidadores de amonio	75
Anexo H. Tubos positivos de oxidadores de nitrito	80
Anexo J. Morfología de las bacterias nitrificantes conocidas	85

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar, si el proceso de nitrificación ocurre generalmente en los suelos ácidos del territorio colombiano. Muestras de suelos, con pH menor de 5.5 y respuesta positiva a la prueba de nitratos fueron tomadas en los municipios de Cocorná (Antioquia), Tota y Tuta (Boyacá), Sabanalarga (Casanare), Villapinzón (Cundinamarca), Puerto Gaitán y Puerto López (Meta), Pasto (Nariño), Puerto Wilches (Santander) y Cunday (Tolima). Cada muestra fue analizada por la actividad nitrificante y densidad de población microbial. Además se realizaron aislamientos con el objeto de identificar las bacterias, basados en comparaciones con los nitrificantes conocidos, en cuanto a morfología y reacción de Gram.

Los resultados obtenidos indican que en todos los suelos hubo nitrificación, siendo mayor casi en todos los suelos sin adición de amonio. Debido a la mineralización de la materia orgánica, el amonio aumentó en todos los suelos; se encontraron densidades entre 3×10^2 (Sabalarga) y 3.5×10^5 (Tuta) para oxidadores de amonio y entre 7×10^2 (Puerto Wilches) y 1.7×10^6 (Puerto López), para oxidadores de nítrito.

Se aislaron bacterias gram negativas con forma de cocos que oxidan amonio a nitrito y bacterias gram negativas en forma de bacilos que oxidan nitrito a nitrato; de acuerdo a comparaciones por medio de fotografías que aparecen en la literatura, los oxidadores de amonio corresponden al género *Nitrosococcus* y los oxidadores de nitrito al género *Nitrobacter*.

SUMMARY

The object of this study was to find out if the nitrification process take place generally in acid soils of the colombian territory. Soil samples with a pH value less than 5.5 and with a nitrate response were taken in the municipalities of Cocorná (Antioquia), Tota and Tuta (Boyacá), Sabanalarga (Casanare), Villapinzón (Cundinamarca), Puerto Galtán and Puerto López (Meta), Pasto (Nariño), Puerto Wilches (Santander) and Cunday (Tolima). Each sample was analyzed of its nitrification activity and its microbial population. Further isolations were realized for bacterial identification based on comparisons with known nitrificants according to their morphology and gram reaction.

The results showed a nitrification in all soil samples, being higher in the samples without ammonium addition. The ammonium content rised in all the soil due to the mineralization of a part of the organic material. Population densities of ammonium oxidation bacteria were found between 3×10^2 (Sabalarga) and 3.5×10^5 (Tuta) and between 7×10^7 (Puerto Wilches) and 1.7×10^8 (Puerto López) of nitrite oxidation bacteria.

Bacteria gram negative were isolated in micrococcus form which oxidize ammonium in nitrite and bacteria in bacile form oxidizer of nitrite to nitrate. According to comparisons with photographs in the literature the oxidizers of ammonium correspond to the species *Nitrosococcus* and the nitrite oxidizers to the species *Nitrobacter*.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Versuche war die Feststellung, ob der Nitrifikationsprozess in den sauren Böden Kolumbiens allgemein statt findet. Für die Versuche wurden 10 Böden aus verschiedenen Gegenden und Klimaten untersucht, die einen pH unter 5.5 und Nitratgehalte aufwiesen. Die Bodenproben stammten aus den Gemeinden Cocorná (Antioquia), Tuta und Tota (Boyacá), Sabanalarga (Casanare), Villapinzón (Cundinamarca), Puerto Gaitán und Puerto López (Meta), Pasto (Nariño), Puerto Wilches (Santander) und Cunday (Tolima). Die einzelnen Bodenproben wurden auf ihre Nitrifikationsaktivität und die Mikrobenzahl untersucht. Ausserdem wurden die Kolonien einzeln untersucht, um die Bakterien zu identifizieren durch morphologische Vergleiche mit Bildern von bekannten Nitrifikanten und durch ihre Gramreaktion.

Die Resultate ergeben, dass in allen 10 Böden Nitrifikation besteht, deren Menge in den Proben ohne Ammoniumzusatz grösser war. Der Ammoniumgehalt stieg in allen Böden aufgrund der Mineralisierung eines Teiles der organischen Substanz des Bodens. Die Anzahl der Ammoniumoxidierenden Bakterien erwies sich zwischen

3×10^2 (Sabanalarga) und 3.5×10^5 (Tuta) und bei den nitrit oxidanten von 7×10^2 (Puerto Wilches) bis 1.7×10^6 (Puerto López).

Es wurden gram-negative bakterien isoliert in kokken form die ammonium zu nitriten oxidieren und gram-negative bakterien in kapsel form die nitrite zu nitraten oxidieren. Durch vergleiche mit bildern aus der literatur entsprechen die ammoniumoxidanten der gattung *Nitrosococcus* und die nitratbildner der gattung *Nitrobacter*.

INTRODUCCIÓN

El proceso de la nitrificación, como parte del ciclo del nitrógeno, juega un papel importante en la disponibilidad de este elemento en plantas y microorganismos que utilizan el nitrato como fuente de energía; los organismos conocidos que participan activamente en este proceso, pertenecen al género de bacterias quimioautótrofas comúnmente llamadas bacterias nitrificantes; la actividad de estas bacterias en el suelo, esta regulada por el suministro de NH_4^+ y O_2 y la influencia de la temperatura, agua del suelo, pH y la interrelación entre estos factores. De acuerdo con investigaciones hechas en países de zonas templadas donde ocurren estaciones, como es el caso de Europa y Estados Unidos, se conoce que el pH óptimo para los nitrificantes está entre 6.5 y 7.8 (Alexander, 1961; citado por Garavito, 1979, p.231) sin embargo, esto no se ajusta a las condiciones de la zona tropical y concretamente al territorio colombiano, donde el 85 % de los suelos tiene un pH por debajo de 5.5 (Suelos - ICA, 1971; IGAC, 1988; citados por Guerrero, 1995; Sánchez, 1983).

En ensayos de nitrificación realizados durante prácticas de laboratorio, en la

cátedra de biología del suelo, gracias al empleo del equipo reflectómetro (RQ-Flex), se verificó que en suelos con pH por debajo de 5.5, ocurría el proceso de nitrificación con buenos niveles de transformación de amonio a nitratos, hecho que causó curiosidad ya que iba en contra de las afirmaciones de que el proceso es seriamente afectado por la acidez del suelo; con esta incertidumbre, surgió la idea de realizar un trabajo de tipo explorativo en suelos de Colombia, para indagar si este fenómeno se presentaba de forma general en los suelos ácidos y comparar además si las bacterias participantes son las mismas que han sido identificadas en las zonas templadas. El estudio se realizó con suelos ácidos de diez municipios ubicados en diferentes zonas geográficas del país.

El propósito del trabajo es generar conocimiento con respecto a la actividad de las bacterias nitrificantes en zonas tropicales que tienen suelos con problemas de acidez, ya que la nitrificación representa un riesgo de pérdida del nitrógeno del suelo y contaminación ambiental. Además, se pretende que este trabajo sirva de base para nuevas investigaciones que contribuyan al esclarecimiento de la microbiología de nuestros suelos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 ORIGEN DEL NITRÓGENO DEL SUELO

Todo el nitrógeno del suelo tiene su origen en el nitrógeno atmosférico, éste entró al suelo por dos caminos: por procesos químicos y por procesos biológicos; el primero se representa en las tormentas eléctricas, que oxidan moléculas de N_2 , las que se disuelven luego en el agua lluvia y llegan así al suelo. En el proceso biológico, el nitrógeno entra al suelo por medio de los azoorganismos, los cuales están representados por bacterias, actinomicetos o cianobacterias; entre estos microorganismos unos llevan a efecto el proceso en forma libre y otros en simbiosis con las plantas. Casi todos los procesos de transformación del nitrógeno en el suelo son microbiológicos (Hanke, 1995).

2.2 CICLO DEL NITRÓGENO

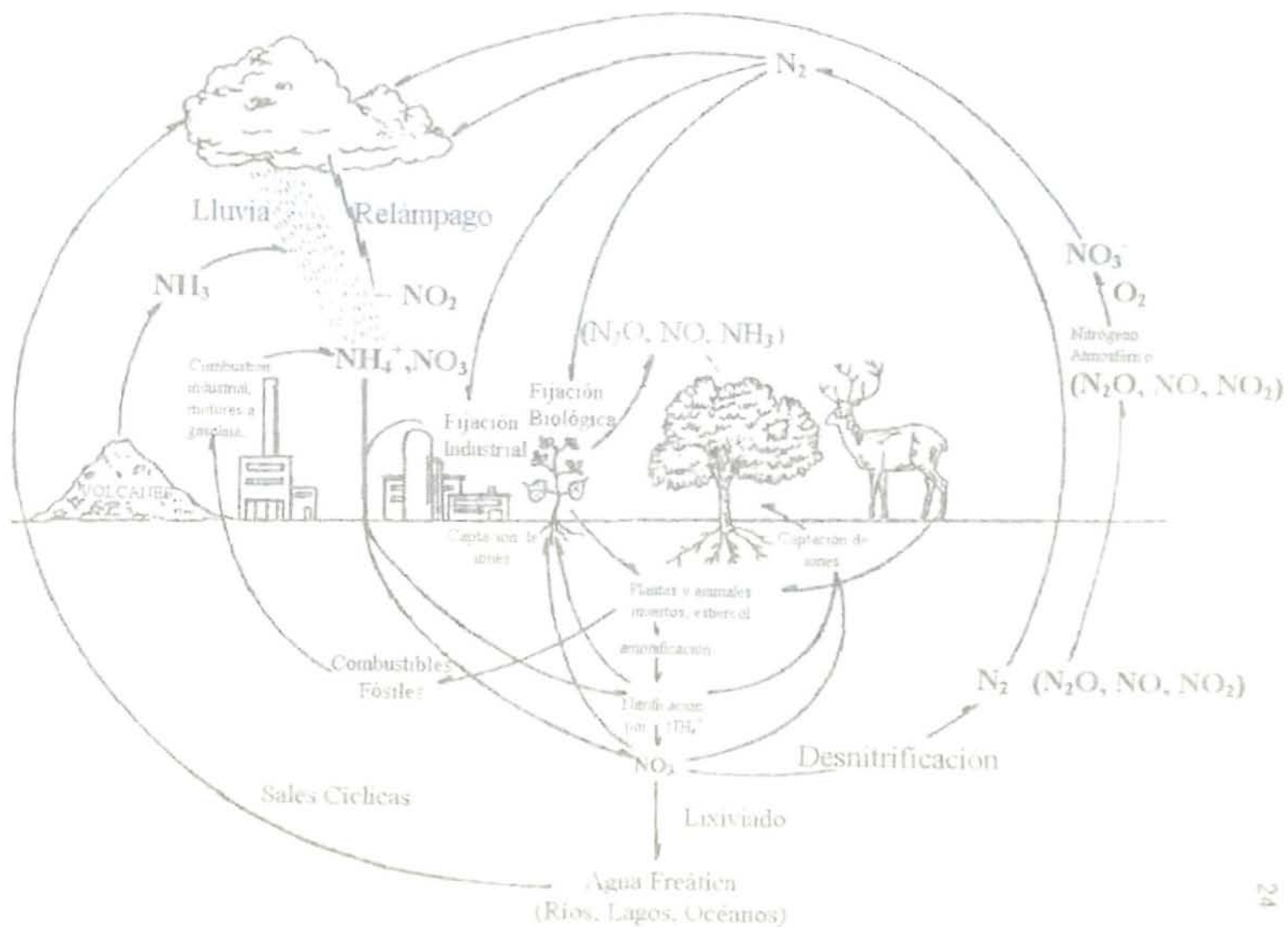
Es el continuo intercambio cíclico entre el nitrógeno combinado del suelo y el nitrógeno molecular de la atmósfera; comprende todas las transformaciones

concernientes a la mineralización de las sustancias orgánicas nitrogenadas y a la pérdida ó ganancia de nitrógeno por el suelo (Enciclopedia Salvat, 1964). Las transformaciones más importantes del ciclo, se resumen en la figura 1.

Aunque el nitrógeno molecular es abundante, constituyendo alrededor del 80% de la atmósfera de la tierra, es químicamente inerte y por lo tanto no es una fuente aprovechable para la mayoría de las formas de vida; la mayor parte del nitrógeno llega a los seres vivos solo después de su **fijación** por microorganismos procariontas, algunos de los cuales se encuentran en las raíces de ciertas plantas; ó mediante **Fijación Industrial** para la manufactura de fertilizantes. Con la lluvia, se desplazan pequeñas cantidades de nitrógeno al suelo, en forma de amonio (proveniente de combustiones industriales, actividad volcánica e incendios forestales) y nitrato (proveniente de la oxidación en la atmósfera de N_2 por el O_2 , ó por el ozono, en presencia de radiación ultravioleta ó tormentas eléctricas y sales nítricas en suspensión, provenientes de la evaporación de las aguas del océano) (Salisbury y Ross, 1996).

La absorción de nitrato y amonio que realizan los vegetales, les permite sintetizar numerosos compuestos nitrogenados, sobretodo proteínas. El estiércol, las plantas, los microorganismos y los animales en proceso de descomposición, son fuentes importantes de nitrógeno que regresan al suelo; casi todos los suelos contienen pequeñas cantidades de compuestos nitrogenados, producidos por la descomposición microbiana de la materia orgánica y por los exudados de las raíces, constituyéndose en reservas de nitrógeno que luego se convierten en

Figura 1. CICLO DEL NITRÓGENO



Fuente : SALISBURY Y ROSS, 1996

amonio y nitrato; hasta el 90% del nitrógeno total de los suelos puede proceder de la materia orgánica, aunque en algunos casos existen cantidades significativas de amonio fijado por los coloides de arcillas (Salisbury y Ross, 1996).

La conversión de nitrógeno orgánico en amonio por microorganismos heterótrofos del suelo, bajo condiciones de buena aireación, se conoce como **amonificación ó mineralización**; luego el amonio es oxidado por bacterias aeróbicas a nitrato; esta oxidación es conocida como **nitrificación** y se lleva a efecto en dos etapas: en la primera, el amonio es oxidado a nitrito y en la segunda el nitrito es oxidado a nitrato. En ausencia de oxígeno, el nitrato es reducido por bacterias anaerobias a nitrito (NO_2^-) óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y finalmente a nitrógeno molecular (N_2); este proceso es conocido como **desnitrificación** y representa una fuente de pérdida del nitrógeno del suelo (Enciclopedia Salvat, 1964; Salisbury y Ross, 1996).

2.3 EL PROCESO DE NITRIFICACIÓN

2.3.1 Definición. La nitrificación se define como la formación biológica de nitrito ó nitrato a partir de sustancias que contienen nitrógeno reducido, en la forma de NH_4^+ (Alexander, 1961, citado por Graham, 1972; Burbano, 1989).

2.3.2 Reseña histórica. Había sido una máxima entre los antiguos químicos que: "La corrupción es madre de la vegetación" y se sabía que la materia vegetal y animal se descomponía y formaba nitratos, pero no se dió una explicación satisfactoria del proceso; sin embargo, las condiciones bajo las cuales se realizaba eran conocidas y en conjunto, descritas con bastante exactitud; al principio, no se observó ninguna relación entre la formación de nitrato y la productividad del suelo, en el año 1856, Way demostró que los nitratos se formaban en los suelos en los que se había incorporado fertilizantes nitrogenados, pero estaba obsesionado con la idea de que el amoniaco era esencial para la planta y creía que este no podía pasar a nitrato en el suelo. Durante la sexta y séptima décadas del siglo pasado, se constató en forma definitiva que las bacterias provocan putrefacción y se pudo concebir que ellas fueron los agentes activos del suelo. Schloesing y Muntz en el año 1877, durante un estudio de purificación de aguas residuales en filtros de tierra, demostraron que la nitrificación es un proceso biológico: el amoniaco de esas aguas después de veinte días, empezó a convertirse en nitrato y finalmente a su paso a través del filtro, todo el amoniaco se convirtió en nitrato y encontraron que el proceso se detenía con un poco de vapor de cloroformo y podía iniciarse de nuevo, después de eliminar el cloroformo con adición de extracto de suelo fresco; R. Warington, demostró además que existían dos etapas en el proceso y dos organismos distintos; el amoniaco era convertido primero en nitrito y luego ese nitrito se convertía en nitrato. Fue S. Winogradsky quien en 1890 aisló estos dos grupos de microorganismos, demostrando que eran bacterias; esto fue de gran importancia en el estudio de los organismos autotróficos; se demostró que la materia orgánica era innecesaria para su metabolismo; Warington aclaró que el

destino final del nitrógeno en el suelo es la formación de nitrato. (Quastel, 1947; Russell y Russell, 1968).

2.3.3 Microorganismos participantes. La nitrificación puede ser llevada a cabo tanto por microorganismos heterotróficos, como por microorganismos quimioautotróficos, de los cuales es más conocida la participación de estos últimos, que son bacterias gram negativas que pertenecen a la familia *Nitrobacteriaceae*; dentro de esta familia se encuentran las especies *Nitrosomonas europea*, *N. Monocella*, *Nitrospira briensis*, *Nitrosococcus nitrosus*, *N. Oceanus*, *Nitrosolobus multiformis*, *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosocystis sp.* y *Nitrosoglea sp.* que oxidan amonio a nitrito y *Nitrobacter winogradsky*, *N. Agilis*, *Nitrospina gracilis*, y *Nitrococcus mobilis* que oxidan nitrito a nitrato. (Mayea et al, 1982; Burbano, 1989; Alleman, 1996; Brock et al. 1994). Todas las bacterias autótrofas que producen nitrificación, obtienen el carbono del anhídrido carbónico y los demás elementos nutritivos necesarios para fines sintéticos los obtienen de sustancias inorgánicas. Dentro de los organismos heterotróficos que participan en la nitrificación, la mayoría pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus* y *Penicillium*; estos organismos difieren de los autótrofos por su habilidad para crecer en medios de peptona y en agar nutritivo (Mayea et al, 1982; Burbano, 1989).

2.3.4 Bioquímica de la nitrificación. De acuerdo con Mayea et al (1982) y Russell y Russell(1968), las reacciones mediante las cuales se efectúa la nitrificación, se lleva a cabo en dos fases:

Nitritación:



Nitratación:



El grupo *Nitrosomonas* necesita oxidar 35 a 70 moles de amoníaco y el *Nitrobacter* 70 a 100 moles de nitrito por mol de carbono asimilado; esto explica porque son organismos de crecimiento tan lento. La oxidación progresa a través de la hidroxilamina, NH_2OH y un extracto de *Nitrosomonas* libre de células que en presencia de citocromo C presente en la célula, oxida la hidroxilamina a nitrito, pasando posiblemente por hiponitrito. La oxidación del amoníaco a hidroxilamina, puede suprimirse selectivamente por inhibidores como aliftiourea y de la hidroxilamina a nitrito por hidrazina. Así, en las primeras etapas de la oxidación, la concentración del ión amonio empieza a decaer varios días antes de que pueda detectarse el nitrito. (Russell y Russell, 1968).

2.3.5 Factores que afectan la nitrificación. Según Alleman (1996), Burbano (1989), Mayea et al. (1982), Teusher y Adler (1985), Tisdale y Nelson (1991), los factores que influyen la actividad y desarrollo de las bacterias nitrificantes son los siguientes:

a. Concentración de iones hidrógeno (pH). El pH óptimo del suelo para la respiración y desarrollo de las bacterias nitrificantes es 6.5 a 8; estas bacterias pueden respirar lentamente en suelos ácidos hasta pH 3.5 y en los alcalinos hasta pH 10. En ausencia de sustancias amortiguadoras, la nitrificación provoca rápidamente la acidificación del suelo en tal grado que inhibe la actividad de las bacterias responsables de este proceso; es por eso que el encalado aumenta considerablemente la nitrificación.

b. Agua. Las bacterias que producen la nitrificación respiran y se desarrollan más rápidamente en suelos que contienen alrededor del 50% de humedad; en cantidades mayores, tiende a formar condiciones anaerobias y en cantidades menores, el agua libre es insuficiente para los microorganismos.

c. Oxígeno libre. Todas las especies de bacterias nitrificantes son aerobias; su respiración y desarrollo se inhiben completamente en condiciones anaerobias.

d. Sales amoniacales. Si las condiciones no favorecen la liberación de amoníaco de la materia orgánica, ó si no se aplican fertilizantes nitrogenados a los suelos, no habrá substrato para la nitrificación.

e. Temperatura. La temperatura óptima está entre 30 y 35 °C, para las bacterias nitrificantes así como para la nitrificación; por debajo de 10 °C y por encima de 40 °C, el proceso se hace muy lento.

f. Materia orgánica. Bajo condiciones de campo, la materia orgánica (restos de plantas, estiércol, microorganismos en descomposición) es oxidada rápidamente por los microorganismos heterótrofos, beneficiándose los nitrificantes al aumentar la disponibilidad de amonio.

2.3.6 Importancia práctica de la nitrificación. En un comienzo se hablaba de lo importante que eran los nitratos por su disponibilidad para ser absorbidos por las raíces de las plantas; sin embargo, hoy en día el concepto ha cambiado; por su alta movilidad, las pérdidas más altas de nitrógeno del suelo ocurren en la forma de nitrato; por tal razón los investigadores, actualmente están utilizando productos como Nitrapyrin, Allylsulfide y Trichloroethylene (Hyman et al, 1995; Juliette et al, 1993; Vannelli and Hooper, 1993) para inhibir la nitrificación y tratar de mantener el nitrógeno en forma de amonio, el cual si es adsorbido por los coloides del suelo y no se pierden por lixiviación (Tisdale y Nelson, 1991).

2.3.7 Nitrificación y contaminación ambiental. El ciclo del nitrógeno ha resultado profundamente alterado por el empleo excesivo de fertilizantes nitrogenados; el equilibrio entre nitrificación y desnitrificación se ha roto, presentándose un exceso

de nitratos, que se acumulan en los suelos, en los tejidos de vegetales como hortalizas y en las corrientes de agua, debido a la lixiviación y escorrentia sobre los suelos, produciéndose inicialmente un efecto de abonado, con la consecuente proliferación de algas y aumento de la eutrofización. Estas situaciones representan riesgos para el medio ambiente y para los usuarios de dichas aguas y de alimentos sobrefertilizados, especialmente en su edad temprana, ya que pueden producir metahemoglobinemia, causada por la absorción excesiva de nitratos en la alimentación y la bebida; a partir de ese nitrato, en las condiciones anaerobias del tracto intestinal, se forman nitritos que luego se combinan con la hemoglobina de la sangre, formándose de este modo metahemoglobina, que es incapaz de retener oxígeno del aire; algo todavía más grave, es que los nitritos formados en el tubo digestivo, pueden también combinarse con las aminas y formar las nitrosaminas, las cuales son potentes agentes cancerígenos. (Camean et al, 1995; Ramade, 1977; Seoanez, 1977).

Los óxidos de nitrógeno (óxido nítrico NO y óxido nítrico N_2O) juegan un papel fundamental en los problemas de contaminación de la atmósfera; se producen cantidades importantes en las combustiones a temperaturas elevadas (motores de explosión, procesos industriales) y como resultado del metabolismo de microorganismos anaerobios (desnitrificación) (Anderson et al. 1993; Salsbury y Ross, 1996), éstos gases afectan la atmósfera de la tierra; en la tropósfera, el NO controla la concentración de O_3 , mientras que el N_2O produce un efecto invernadero, causando destrucción de la capa de ozono en la estratósfera (Logan, J. A. 1981; Turco, R. P. 1985, citados por Anderson et al, 1993). El NO además

puede reaccionar con el oxígeno atmosférico, transformándose en NO_2 ; este NO_2 por su parte puede seguir dos caminos: en el primero, reacciona con vapor de agua del aire y se transforma en HNO_3 , el cual reacciona rápidamente con cationes presentes en el aire, formando así sales nítricas que permanecen en la atmósfera hasta que caen al suelo con las precipitaciones, en forma de lluvia ácida; en el segundo camino, el NO_2 experimenta una disociación fotoquímica, convirtiéndose en NO y O^\cdot , este oxígeno atómico, a su vez reacciona con oxígeno atmosférico, en presencia de catalizadores metálicos para formar O_3 ; el oxígeno atómico y el ozono formados, actúan sobre hidrocarburos no quemados, provenientes de la combustión de los automóviles, para transformarse en alcoholperóxidos y peroxiacilos; estos últimos reaccionan nuevamente con más NO_2 presente en la atmósfera para producir sustancias conocidas como los PAN (Peroxí - Acil - Nitratos); los PAN en una concentración de pocas ppb, pueden provocar una fuerte irritación ocular y serios daños a los tejidos vegetales (Fitotoxicidad). (Stephens, 1969, citado por Ramade, 1977).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Suelos. Se utilizaron suelos de diez municipios, distribuidos en diferentes regiones geográficas del territorio nacional (Figura 2); los nombres y características de cada municipio se dan en la tabla 1

Tabla 1. Características de los Municipios Muestreados

Municipio	Departamento	Zona de Muestreo	pH	Altura (msnm)
Cocorná	Antioquia	Vereda El Tesoro	4.90	1300
Cunday	Tolima	Corregimiento La Aurora, vereda San Francisco	4.40	1500
Pasto	Nariño	*	4.60	2600
Puerto Galbán	Meta	Granja experimental Carimagua	4.70	150
Puerto López	Meta	Sector La Balsa - Pachaquiara	4.40	200
Puerto Wilches	Santander	*	4.70	150
Sabanalarga	Casanare	Corregimiento Agua Clara, sector Villa Carola	4.70	700
Tota	Boyacá	Vereda Estóquechá	5.00	3200
Tota	Boyacá	*	4.90	2300
Villapinzón	Cundinamarca	Vereda Chicuala	4.80	2200

* Muestras enviadas por colaboradores sin especificar zona de muestreo

FIGURA 2. Distribución de los Municipios Seleccionados para el Muestreo



3.1.2 Laboratorio. El trabajo se realizó en los Laboratorios de Suelos y de Microbiología de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), con sede en la ciudad de Tunja, que en conjunto cuentan con equipos y materiales necesarios para la ejecución del proyecto, tales como cámara de flujo laminar, incubadora, balanza analítica y vidriería.

3.1.3 Equipo de campo. Además de las herramientas esenciales para el muestreo de suelos, como barreno y balde, se contó con un reflectómetro (RQ-Flex Merck).

3.1.4 Reactivos. Se tuvo a disposición los reactivos necesarios para la preparación de los medios de cultivo específicos para el crecimiento de los microorganismos nitrificantes (Cuadro 1), los cuales fueron suministrados por la UPTC y además, para el uso del reflectómetro, se tuvo a disposición cintas reactivas para pruebas de pH y nitratos, las cuales fueron suministradas por la empresa MERCK COLOMBIA S.A.

3.2 METODOS

Cuadro 1. Reactivos para la preparación de solución buffer y medios de cultivo.

Constituyente Químico	Concentración de la solución Estandar gr/100 ml H ₂ O	Solución Estandar Requerida por litro		
		Solución Buffer	Oxidadores de Amonio	Oxidadores de Nitrito
		ml	ml	ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.00		2.0	
KNO ₃	0.85			1.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.34		1.0*	1.0*
MgSO ₄	4.00		1.0*	5.0*
Verde de Bromocresol	0.04		2.0	
K ₂ HPO ₄ (0.2M)	3.48	4.0		4.0
KH ₂ PO ₄ (0.2M)	2.72	1.0	7.5	1.0
Hierro Quelatado			1.0	1.0
FeSO ₄ 7H ₂ O	246.00			
EDTA Disodio	0.331			
Elementos Trazas			1.0	1.0
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.01			
MnCl ₂	0.02			
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0002			
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.01			
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.002			

FUENTE: Schmidt y Belser, 1982

3.2.1 Selección de los Municipios.

Se efectuó una revisión de bibliografía correspondiente a estudios generales de suelos realizados por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (1980 a, 1980 b, 1979, 1772); además gracias a la colaboración de Ingenieros Agrónomos que enviaron muestras de los municipios de Pasto, Puerto Wilches y Puerto Gaitán.

3.2.2 Muestreo de Suelos.

En cada uno de los municipios se ubicó una vereda y se realizó el muestreo, en suelos de uso agrícola, siguiendo el procedimiento siguiente:

- a. Se observó el área de muestreo y se subdividió en secciones aproximadamente uniformes, de acuerdo con el relieve y color del suelo, principalmente.
- b. De cada sección, se tomaron varias submuestras siguiendo un recorrido en zig-zag, a profundidad hasta 30 cm.
- c. Todas las submuestras fueron reunidas y bien mezcladas.
- d. Mediante el uso del reflectómetro, se verificó que el pH de la muestra estuviera por debajo de 5.5 y que la respuesta a la prueba de nitratos fuera positiva.
- e. Una vez verificado el pH y la prueba de nitratos, se empacó un Kg de suelo en una bolsa plástica negra, marcada con el nombre del municipio y con un atomizador se adicionó agua destilada para mantener las condiciones de humedad del suelo.

f. Al cerrar la bolsa se tuvo la precaución de mantener condiciones de buena aireación para su posterior transporte al laboratorio.

3.2.3 Pruebas de laboratorio.

Según los procedimientos descritos por Schmidt y Belser (1982), cada una de las muestras fue sometida a las pruebas siguientes:

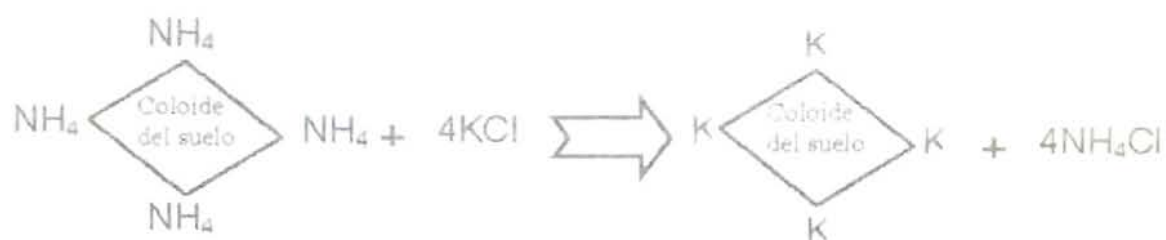
3.2.3.1 Actividad Nitrificante en el Suelo.

Se tomaron 100 g de suelo en cada uno de cuatro recipientes limpios y secos; a dos de éstos se adicionó aproximadamente 1.25 ml. de una solución de sulfato de amonio 1.2 N, después de 24 horas se valoró la cantidad de amonio y nitrosos iniciales en los recipientes; se llevaron a incubación a temperatura ambiente en la oscuridad y humedad cercana a capacidad de campo por cuatro semanas.

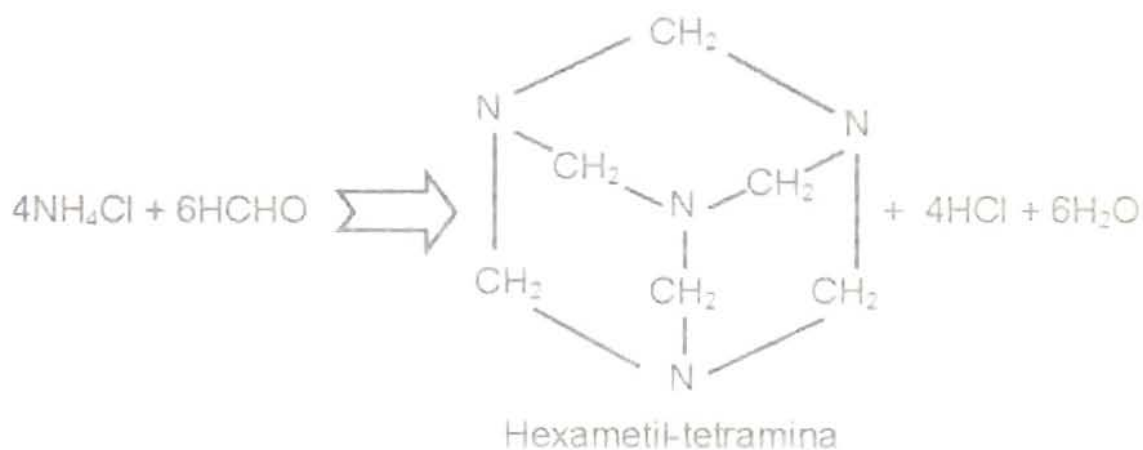
Durante este tiempo de incubación se hicieron valoraciones de nitratos al comienzo, a la tercera semana y al final de la prueba y de amonio al inicio y semanalmente.

a. Procedimiento para Valorar Amonio.

Se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado de 50 ml, se adicionó 25 ml de KCl 1N y luego se agitó y filtró, con el fin de extraer el amonio de acuerdo a la reacción:



Del filtrado, se tomaron 10 ml, se les adicionó 3 gotas de fenoftaleína y se tituló con NaOH 0,01N hasta coloración rosada, con el fin de neutralizar la acidez de la solución; enseguida se adicionó 5 ml de formaldehido, con lo cual la solución se torna incolora debido a la formación de ácido, según la reacción:



La cantidad de moléculas de ácido formado, son equivalentes a la cantidad de moléculas de amonio presentes en el suelo, por lo que al titular con NaOH 0.01N, se obtuvo de forma indirecta la cantidad de amonio presente en el suelo.

Cálculos:

Se toma como ejemplo un suelo en el que se gastaron 1.2 ml de NaOH 0.01 N en la titulación.

Inicialmente se tiene 10 g de suelo diluidos en 25 ml de KCl 1N, lo que quiere decir que los 10 ml del filtrado que se tomaron para titular, corresponde a 4 gr de suelo.

Los ml de NaOH 0.01N que se gastaron en la titulación se convierten a ml de NaOH 1N dividiendo por 100; cada ml de NaOH 1N corresponde a un miliequivalente de amonio.

$$\frac{1.2 \text{ ml NaOH } 0.01 \text{ N}}{100} = 0.012 \text{ ml NaOH } 1 \text{ N}$$

(ml NaOH 1N) x (Peso de un meq de NH_4^+) = mg de NH_4^+ en 4 g de suelo.

$$0.012 \times 18.039 \text{ mg} = 0.216 \text{ mg } \text{NH}_4^+ \text{ en } 4 \text{ g de Suelo}$$

$$\begin{array}{l} 0.216 \text{ mg } \text{NH}_4^+ \longrightarrow 4 \text{ g de Suelo} \\ X \longrightarrow 100 \text{ g de Suelo} \end{array}$$

$X = 5.4 \text{ mg NH}_4^+$ en 100 g de suelo = 54 mg NH_4^+ en 1000 g de suelo

$X = 54 \text{ ppm de NH}_4^+$

$54 \text{ ppm de NH}_4^+ \times 0.7765 = 41.93 \text{ ppm de Nitrógeno amoniacal (N-NH}_4)$

la constante 0.7765 corresponde al porcentaje en peso, del nitrógeno, dentro de la molécula de amonio.

Resumiendo:

$$\left(\frac{\text{ml NaOH } 0.01\text{N}}{100} \right) \times (\text{Peso } 1 \text{ meq. NH}_4^+) \times \left(\frac{100 \text{ g Suelo}}{4 \text{ g Suelo}} \right) \times 10 \times 0.7765 =$$

$$\boxed{\text{ml NaOH } 0,01\text{N} \times 35,018 = \text{ppm de N-NH}_4}$$

b. Procedimiento para Valorar Nitrato

Para la valoración inicial se tomaron 5 g de suelo y se diluyeron en 15 ml de agua destilada, para una relación agua : suelo 3:1; se filtró y se hizo la valoración con el reflectómetro (R-Q Flex Merck).

Para las otras valoraciones se tomaron 3 g de suelo y se diluyeron en 45 ml de agua destilada para una relación agua : suelo 15 : 1.

Cálculos:

Se tomó como ejemplo un suelo cuya lectura en el reflectómetro dio 39 mg / lt

Inicialmente se tiene 5 g de suelo en 15 ml de agua; en un litro de agua habrá:

$$\begin{array}{l} 5 \text{ g Suelo} \longrightarrow 15 \text{ ml de H}_2\text{O} \\ X \longrightarrow 1000 \text{ ml de H}_2\text{O} \\ X = 333.33 \text{ g de suelo} \end{array}$$

En esos 333.33 g de suelo hay 39 mg de NO_3^- . En 1000 g de suelo habrá:

$$\begin{array}{l} 333.33 \text{ g Suelo} \longrightarrow 39 \text{ mg de NO}_3^- \\ 1000 \text{ g de Suelo} \longrightarrow X \end{array}$$

$$X = 117 \text{ mg de NO}_3^- \text{ en 1 Kgr. de Suelo} = 117 \text{ ppm NO}_3^-$$

$$117 \text{ ppm de NO}_3^- \times 0.2259 = 26.43 \text{ ppm de Nitrógeno nítrico (N-NO}_3^-)$$

La constante 0.2259 corresponde al porcentaje, en peso, del nitrógeno dentro de la molécula de nitrato.

Resumiendo:

$$\left(\frac{1000 \text{g Suelo} \times \text{Lectura Reflectómetro}}{\frac{5 \text{g Suelo} \times 1000 \text{ ml Agua}}{15 \text{ ml Agua}}} \right) \times 0.2259 = \text{ppm de N-NO}_3^-$$

$$\text{Dilución} \times \text{lectura reflectómetro} \times 0.2259 = \text{ppm de N-NO}_3^-$$

$$\text{Lectura Reflectómetro} \times \text{Dilución} \times 0.2259 = \text{ppm N-NO}_3$$

3.2.3.2 Densidad de Población.

Se transfirieron diez gramos de suelo a una botella de dilución con 95 ml de solución buffer (Cuadro 1), para obtener una dilución 10^{-1} ; se agitó vigorosamente por 15 minutos; de ésta dilución se transfirió una alícuota de diez ml a otra botella de dilución, con 90 ml de solución buffer, usando una pipeta esterilizada; se obtuvo así una dilución 10^{-2} ; se continuó con este procedimiento, utilizando botellas con 90 ml de solución buffer y pipetas diferentes para cada transferencia, hasta obtener una dilución 10^{-10} .

De la botella de dilución 10^{-10} se transfirió una alícuota de un ml a cada uno de cinco tubos, con medio de cultivo específico para organismos oxidadores de amonio, cuatro ml de medio por cada tubo. Se hizo lo mismo con cada una de las diluciones restantes, en tubos de cultivo diferentes. Para los organismos oxidadores de nitrito, se realizó el mismo procedimiento de inoculación, pero en tubos con medio específico para oxidadores de nitrito. La composición de los medios de cultivo aparece en el Cuadro 1.

Los tubos de cultivo se sometieron a incubación en la oscuridad a temperatura ambiente durante seis semanas.

a. Determinación de la población de Oxidadores de Amonio.

Se determinó en cada uno de los tubos, por observación directa, del cambio de coloración de azul a amarillo, en el indicador de pH del medio de cultivo. Este cambio se manifiesta por acidificación del medio de cultivo al ocurrir una liberación de iones H^+ del NH_4^+ , al ser transformado en NO_2^- por los microorganismos. Se tomaron como positivos los tubos que manifestaron coloración amarilla.

b. Determinación de la población de Oxidadores de Nitrito.

Esta determinación se realizó a cada uno de los tubos, mediante el uso del reactivo de Tromsdorf (Anexo A). En un vidrio de pruebas múltiples, se colocó una gota del reactivo de Tromsdorf, una gota de ácido sulfúrico del 25% y una gota del medio a determinar la presencia de nitrito; la manifestación de color azul intenso indica que está presente el nitrito y la manifestación incolora, significa que el nitrito ya ha sido consumido y transformado a nitrato por los microorganismos. Se tomaron como positivos los tubos que dan incoloro al reactivo de tromsdorf.

c. Cálculo del número más probable de microorganismos (Método de Mac. Crady)

Se tiene sembrados cinco tubos por cada tipo de dilución; se anota el número de tubos positivos para cada dilución al final de la incubación; cada tubo positivo contiene por lo menos un germen que es responsable de la transformación; a continuación, se expresa en la tabla de número más probable NMP (Anexo B), la disposición de los resultados.

Para encontrar en la tabla, el número más probable de microorganismos, es necesaria la determinación del número característico, el cual se representa por tres cifras, de las cuales la primera corresponde a la dilución menos concentrada donde los cinco tubos fueron positivos. Como ejemplo se toma el suelo de Cocorná, donde se obtuvo al final de la incubación los siguientes resultados:

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Tubos (+)NH ₄ ⁺	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubos (+)NO ₂ ⁻	5	5	5	5	2	2	0	0	1	0

El número característico para oxidadores de amonio es 500 y para oxidadores de nitrito 522; estos números se buscan en la tabla de Mc. Crady (Anexo B) de donde se obtiene:

	Número Característico	NMP de Microorganismos
Oxidadores de NH ₄ ⁺	500	2,5
Oxidadores de NO ₂ ⁻	522	9,5

El número de microorganismos por muestra, se calcula multiplicando el NMP por la dilución menos concentrada donde se obtuvo los cinco tubos positivos, teniendo en cuenta el volumen de dilución inoculado en los tubos (en este caso es de un ml).

Oxidadores de NH_4^+ : $2.5 \times 10^3 = 2500$ microorganismos en un g suelo

Oxidadores de NO_2^- : $9.5 \times 10^4 = 95000$ microorganismos en un g suelo

3.2.3.3 Aislamiento de las Bacterias Nitrificantes.

De cada uno de los tubos de cultivo positivos en la prueba de densidad de población, se tomó una alícuota de un ml., se inoculó en tubos de ensayo con medio de cultivo fresco y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente con el fin de multiplicar las poblaciones; al cabo de seis semanas, se hicieron observaciones al microscopio, para verificar que los cultivos no estuvieran contaminados.

3.2.3.4 Identificación de los Nitrificantes.

Se realizó una tinción de gram y se hicieron observaciones al microscopio de cada uno de los organismos, para determinar su reacción a la tinción y su morfología; posteriormente se compararon con características de los nitrificantes conocidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 PRUEBA DE TRANSFORMACIÓN DE AMONIO EN NITRATO.

En las tablas 2 y 3, se muestran los resultados de la transformación de nitrógeno amoniacal ($N-NH_4$) en nitrógeno nítrico ($N-NO_3$); los datos originales de los cuales se obtuvieron estos resultados, aparecen en los anexos C, D, E y F. Para una mejor visualización de las variaciones, estos mismos resultados se presentan en las figuras 3, 4, 5 y 6.

En los suelos sin adición de sulfato de amonio, la cantidad de $N-NH_4$, durante el inicio y la tercera semana aumentó en Puerto Gaitán, Puerto Wilches y Sabanalarga; en los demás, hubo una disminución (Tabla 2 y Figura 3). Entre la tercera y cuarta semana, el $N-NH_4$ aumentó en Cunday, Puerto Gaitán, Puerto López, Puerto Wilches, Sabanalarga y Tuta; permaneció constante en Cocorná y Pasto, mientras que en Tota y Villapinzón se dio una disminución en estos valores (Tabla 2 y Figura 3). En la tabla 4 se pueden observar las cantidades de $N-NH_4$ que se oxidó durante el periodo de la incubación.

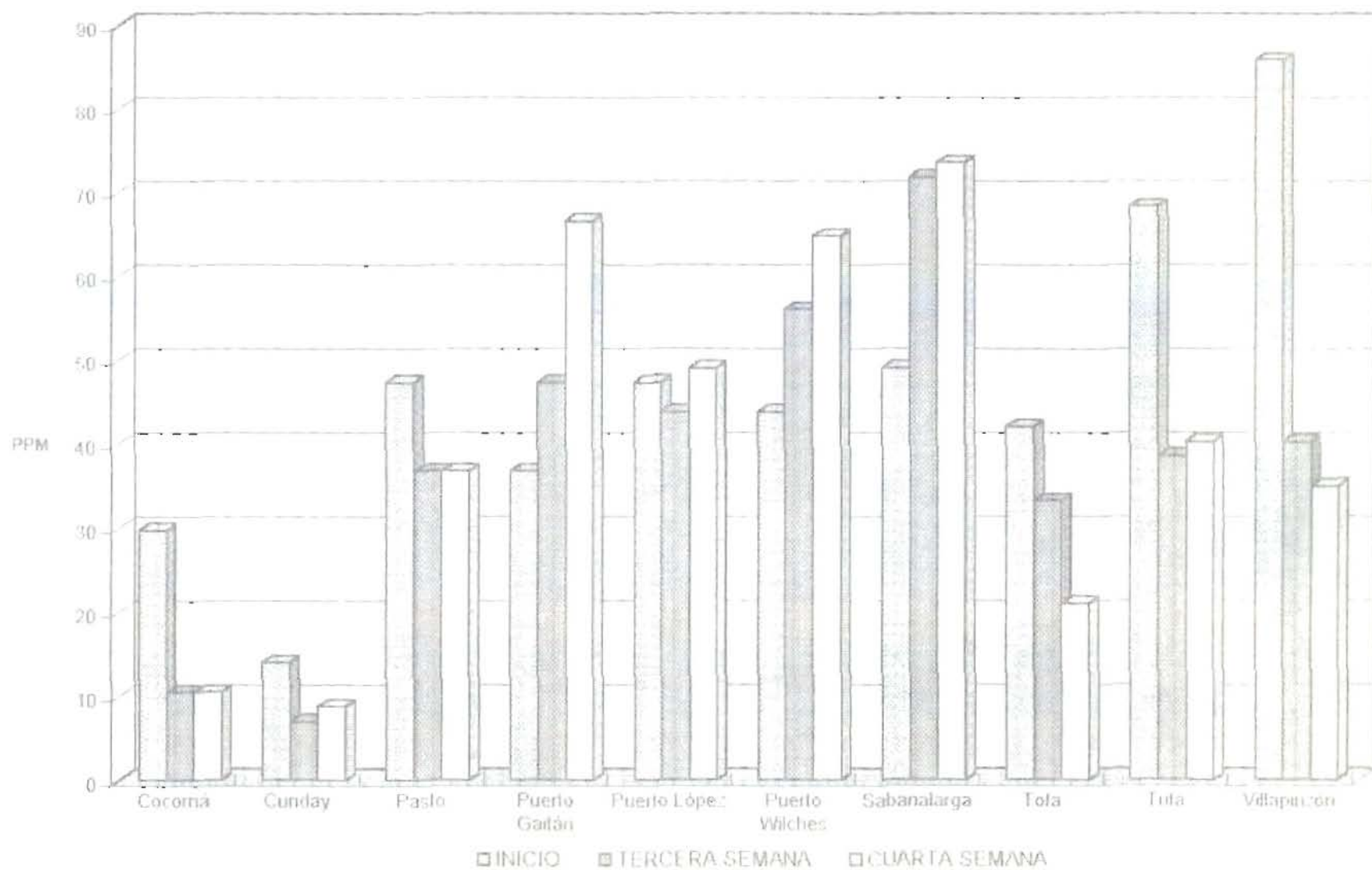


FIGURA 3. VARIACIÓN DEL N-NH4 EN SUELOS SIN ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO

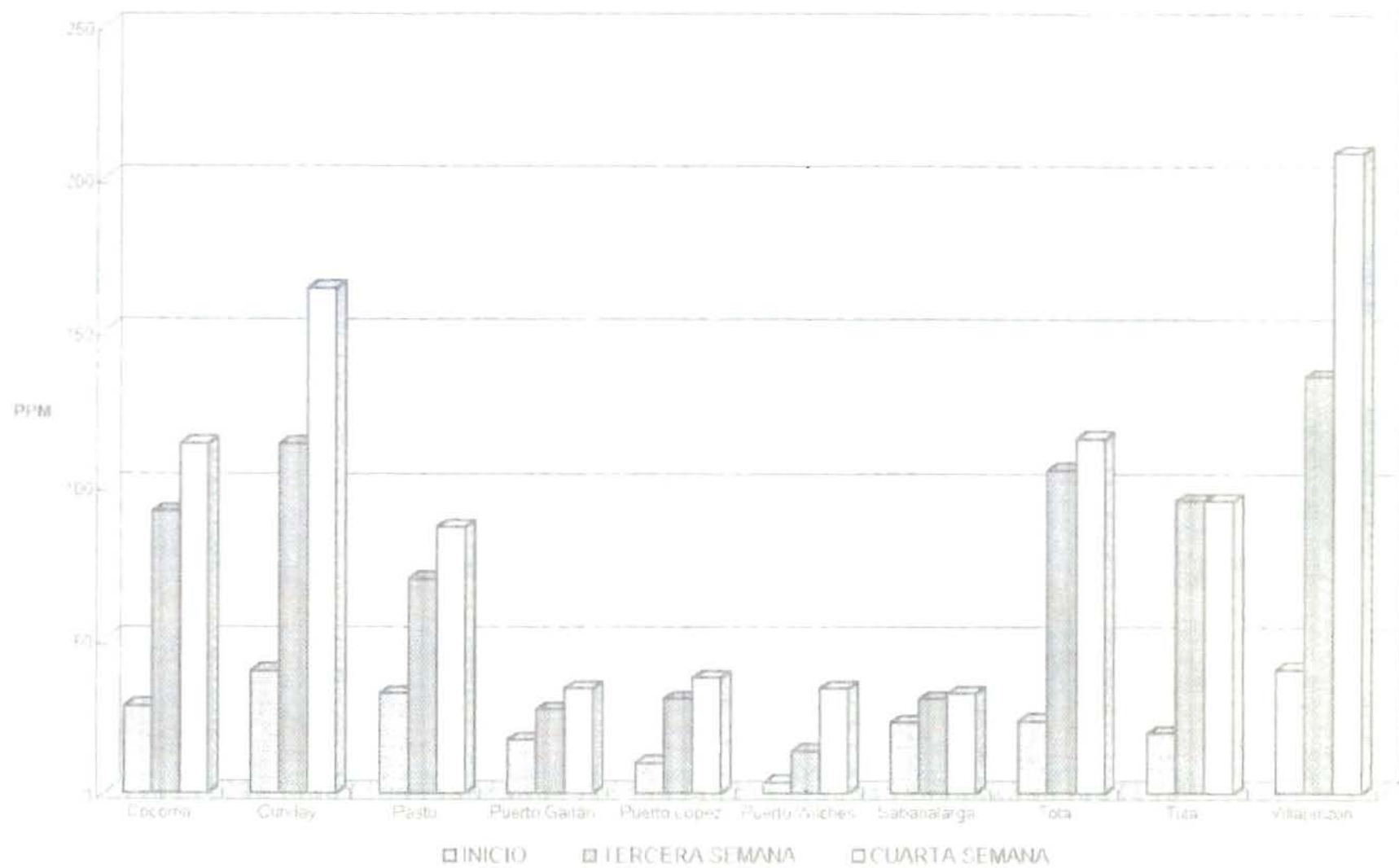


FIGURA 4. VARIACIÓN DEL N-NO₃ EN SUELOS SIN ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO

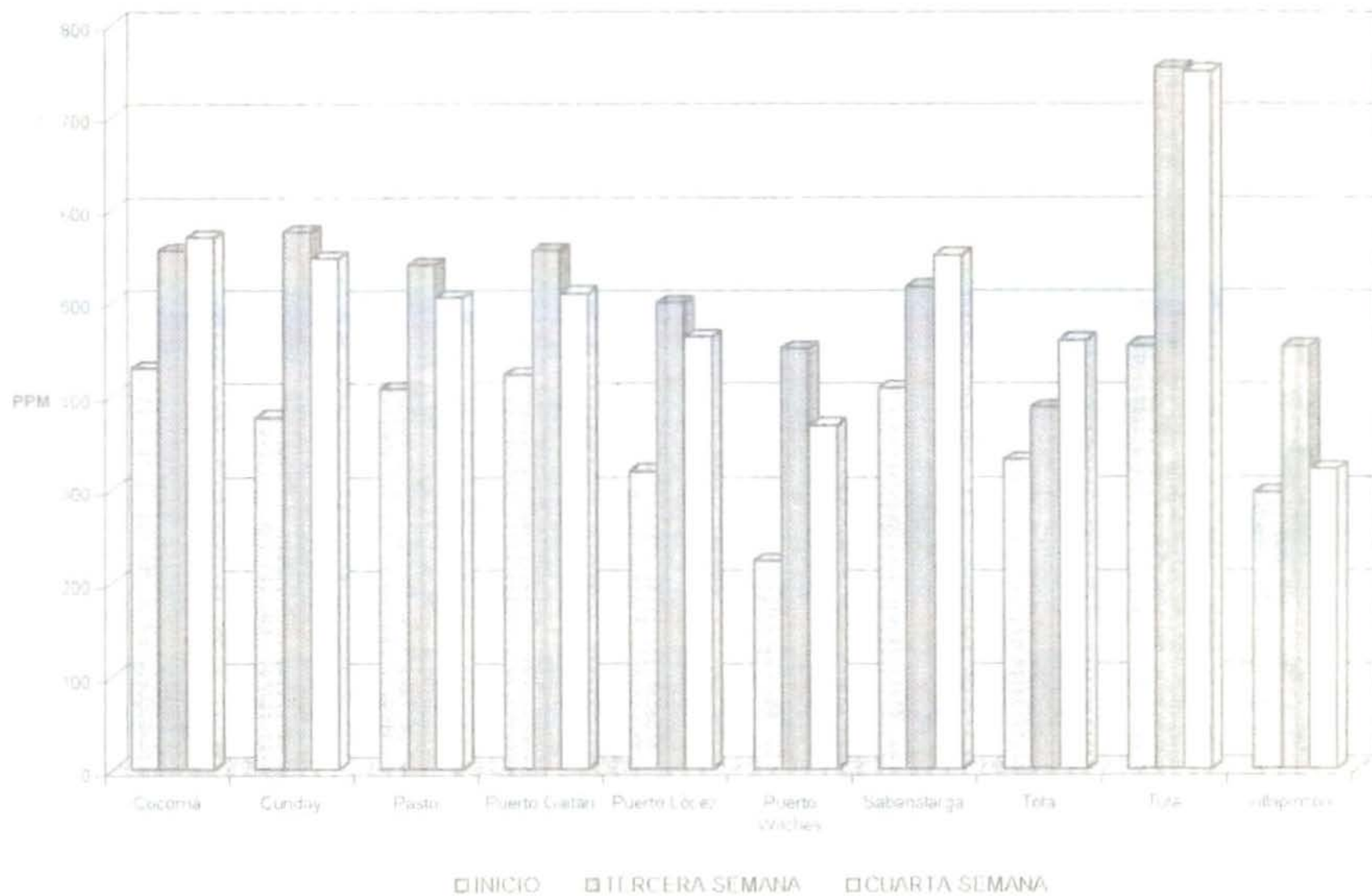


FIGURA 5. VARIACIÓN DEL N-NH₄ EN SUELOS CON ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO

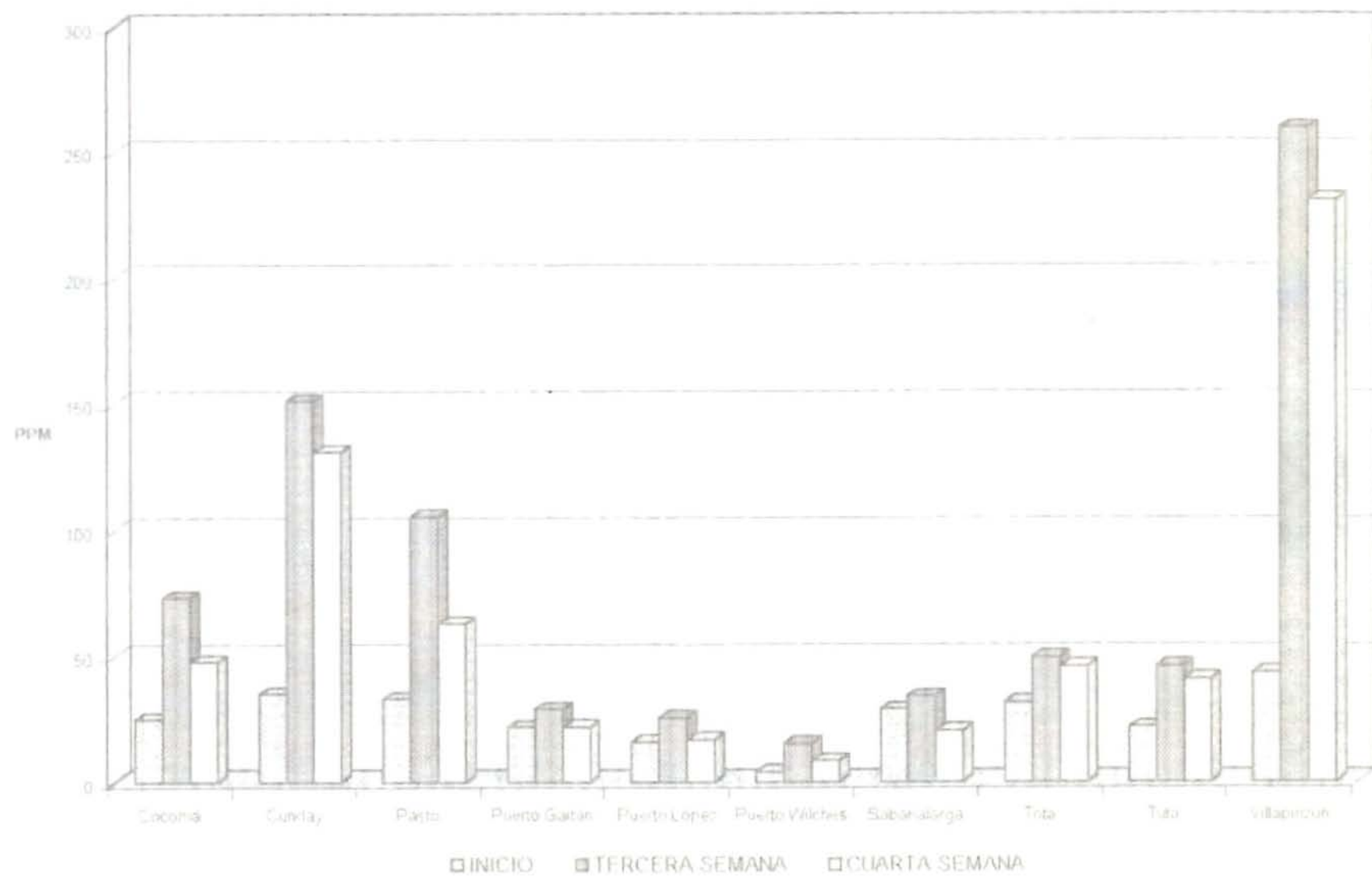


FIGURA 6. VARIACIÓN DEL N-NO₃ EN SUELOS CON ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO

Tabla 2. Presencia de N-NH₄ y N-NO₃ en suelos sin adición de sulfato de amonio al inicio, tercera y cuarta semana de incubación

Municipio	N-NH ₄ (ppm)			N-NO ₃ (ppm)		
	0	3	4	0	3	4
Cocorná	29.76	10.50	10.50	28.12	91.49	113.51
Cunday	14.00	7.00	3.75	39.65	113.51	164.34
Pasto	47.27	36.77	38.77	32.19	69.46	86.41
Puerto Gaitán	36.77	47.27	66.53	17.28	27.11	33.89
Puerto López	47.27	43.77	49.03	9.83	30.50	37.27
Puerto Wilches	43.77	56.03	64.78	3.39	13.55	33.89
Sabanalarga	49.03	71.77	73.54	22.70	30.50	32.19
Tota	42.02	33.27	21.01	23.38	105.04	115.21
Tuta	68.29	38.52	40.27	19.31	94.88	94.86
Villapinzón	85.79	40.27	35.02	39.98	135.54	208.39

Tabla 3. Presencia de N-NH₄ y N-NO₃ en suelos con adición de sulfato de amonio al inicio, tercera y cuarta semana de incubación

Municipio	N-NH ₄ (ppm)			N-NO ₃ (ppm)		
	0	3	4	0	3	4
Cocorná	428.97	555.04	569.04	24.74	72.85	47.44
Cunday	378.44	574.29	546.28	34.80	150.79	130.46
Pasto	406.21	539.28	504.26	32.87	105.04	62.69
Puerto Gaitán	421.97	555.04	509.51	21.69	28.80	22.03
Puerto López	318.66	499.00	462.24	15.89	25.41	16.94
Puerto Wilches	222.36	449.98	387.69	4.07	15.25	8.47
Sabanalarga	407.96	518.56	549.78	28.80	33.89	20.33
Tota	330.92	386.95	458.74	31.51	49.13	45.74
Tuta	453.48	751.14	747.63	21.69	45.74	40.66
Villapinzón	295.90	451.73	320.41	43.03	259.22	230.42

En los suelos con adición de sulfato de amonio, el N-NH₄ aumentó en todos los suelos entre el inicio y la tercera semana de incubación (Tabla 3 y Figura 5); entre la tercera y cuarta semana, se incrementó en Cocorná, Sabanalarga y Tota, en los demás suelos, hubo una disminución en estos valores (Tabla 3 y Figura 5).

Tabla 4. Cantidad de N-NH₄ oxidado e incremento de N-NO₃ incrementado en suelos sin adición de sulfato de amonio

Municipio	N-NH ₄ Oxidado (ppm)		N-NO ₃ incrementado (ppm)		
	0 a 3 semanas	3 a 4 semanas	0 a 3 semanas	3 a 4 semanas	0 a 4 semanas
Cocomá	10.26	—	63.37	22.02	85.39
Cunday	7.00	1.75*	73.86	50.83	124.69
Pasto	10.55	—	37.27	16.95	54.22
Puerto Gaitán	10.55*	19.26*	9.83	6.78	16.61
Puerto López	3.50	5.28*	20.67	6.77	27.44
Puerto Wilches	16.28*	8.75*	10.16	20.34	30.50
sabanalarga	22.74*	1.77*	7.80	1.88	9.49
Tota	8.75	12.26*	81.66	10.17	91.83
Tuta	29.77	1.75*	75.57	—	75.57
Villapinzón	45.52	5.25*	95.56	72.85	168.41

Nota: Los valores con (*) indican aumento de N-NH₄ o disminución de N-NO₃

En la tabla 5 se dan las cantidades de N-NH₄ que se oxidó en cada suelo durante la incubación.

Tabla 5. N-NH₄ oxidado y N-NO₃ incrementado en suelos con adición de sulfato de amonio

Municipio	N-NH ₄ oxidado (ppm)		N-NO ₃ incrementado (ppm)		
	0 a 3 semanas	3 a 4 semanas	0 a 3 semanas	3 a 4 semanas	0 a 4 semanas
Cocomá	126.07*	14.00*	48.11	25.41*	48.11
Cunday	197.85*	28.01	115.89	20.43*	115.89
Pasto	133.07*	35.02	72.17	42.35*	72.17
Puerto Gaitán	133.07*	45.53	7.11	6.77*	7.11
Puerto López	180.34*	36.76	9.72	8.47*	9.72
Puerto Wilches	227.62*	82.29	11.18	6.78*	11.18
Sabanalarga	108.58*	33.26*	5.09	13.56*	5.09
Tota	56.03*	71.79*	17.62	3.39*	17.62
Tuta	297.66*	3.51	24.05	5.08*	24.05
Villapinzón	155.83*	131.32	216.19	28.6*	216.19

Nota: Los valores con (*) indican aumento de N-NH₄ o disminución de N-NO₃

El nitrógeno amoniacal que se incrementó, proviene de la mineralización de la materia orgánica, ya que las condiciones bajo las cuales se desarrolló la prueba no solo favorecen la actividad de los microorganismos nitrificantes sino que también favorecen el metabolismo de todos los microorganismos aeróbicos del suelo; los porcentajes de materia orgánica mineralizada durante la prueba se aprecian en la tabla 6; aquí se puede ver claramente que en todos los suelos hubo aporte de amonio proveniente de la materia orgánica.

Tabla 6. Análisis de la materia orgánica de los suelos

Municipio	% de Materia Orgánica		
	Inicial	Final cuarta semana	Mineralizada
Cocomá	3.39	2.40	29.20
Cunday	21.88	21.00	4.00
Pasto	6.58	6.12	6.70
Puerto Gaitán	2.40	2.18	9.20
Puerto López	2.58	1.75	32.20
Puerto Wilches	1.64	1.20	34.80
Sabanalarga	3.50	2.18	37.70
Tota	9.19	7.44	19.00
Tuta	6.12	5.69	7.00
Villapinzón	10.06	9.62	4.40

Los valores de $N-NO_3^-$ entre el inicio y la tercera semana aumentaron en todos los suelos (con y sin adición de sulfato de amonio) como se puede ver en las tablas 2 y 3 y figuras 4 y 6; las cantidades de $N-NO_3^-$ incrementado en cada suelo se aprecian en las tablas 4 y 5. Entre la tercera y cuarta semana, los suelos sin adición de amonio mantuvieron una tendencia creciente en estos valores, excepto en Tuta, donde permaneció constante (Tabla 2, Figura 4); mientras que en todos los suelos con adición de amonio, hubo un descenso (Tabla 3, Figura 6).

En la mayoría de los suelos sin adición de amonio, hubo mayor incremento de N-NO_2^- durante la prueba, exceptuando a Pasto y Villapinzón que tuvieron valores más altos cuando se adicionó amonio. Ya hay informes de que el sulfato de amonio reduce la nitrificación; según Arana (1971) durante ensayos de fertilización, se presentó menor nitrificación en suelos donde se adicionó por 12 años sulfato de amonio; sin embargo en los suelos de Pasto y Villapinzón con adición de amonio, posiblemente por el alto contenido de materia orgánica (Tabla 6), se redujo la influencia del sulfato de amonio sobre los organismos nitrificantes, beneficiándose la nitrificación. Al adicionar el sulfato se produce un efecto de mayor acidez en el suelo, pero se descarta que sea la acidez la que reduce la nitrificación, ya que los valores de pH al final de la prueba fueron similares con y sin adición de sulfato de amonio (Tabla 7), de ahí que el efecto puede ser más por intoxicación de los nitrificantes por el exceso de ambos iones, tanto amonio como sulfato.

Tabla 7. Variación del pH de los suelos

Municipio	pH Inicial	pH Final (Cuarta semana)	
		Sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Cocorna	4.90	4.05	4.28
Cunday	4.40	3.99	4.25
Pasto	4.80	4.58	4.55
Puerto Gaitán	4.70	4.11	4.27
Puerto López	4.40	4.37	4.38
Puerto Wilches	4.70	3.94	3.94
Sabanalarga	4.70	3.99	3.93
Tota	5.00	3.97	4.09
Tuta	4.90	4.16	4.02
Villapinzón	4.80	3.96	4.09

No se hicieron pruebas de nitrógeno total en el suelo, ya que el equipo no estaba en funcionamiento, por lo tanto no se puede afirmar con exactitud si la disminución de los nitratos durante la última semana en los suelos con sulfato de amonio fue por desnitrificación ó inmovilización por incorporación al cuerpo de los microorganismos y adsorción a los coloides del suelo (E. de Benavides (1977) citada por Garavito (1979) encontró que la adsorción de nitratos al suelo, es inversa al valor de pH de la solución y correlaciona con los contenidos de alófana, sílice y alúmina amorfa).

4.2 DENSIDAD DE POBLACIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES

La densidad de población de las bacterias nitrificantes de cada una de las muestras de suelo se presentan en las tablas 8 y 9; los datos originales en laboratorio, a partir de los cuales se obtuvieron estos valores, se dan en los anexos G y H.

Se analizaron por separado las muestras del altiplano cundiboyacense (Villapinzón, Tuta y Tota) y las muestras de los llanos orientales (Sabanalarga, Puerto López y Puerto Gaitán), ya que cada grupo, en conjunto, representan regiones uniformes en cuanto a ubicación y clima; las demás muestras (Pasto,

Cocorná, Cunday y Puerto Wilches) no se relacionaron en grupo por sus marcadas diferencias en los parámetros anteriores.

Tabla 8. Densidad de poblaciones de bacterias oxidadoras de amonio en los suelos

MUNICIPIO	No. Característico	No. Más Probable	Dilución*	No. De Células / gr. de suelo ($\times 10^3$)
Cocorná	500	2.5	10^{-3}	0.25
Cunday	530	8.0	10^{-2}	0.8
Pasto	500	2.5	10^{-2}	0.25
Puerto Wilches	510	3.5	10^{-2}	0.35
Puerto López	500	2.5	10^{-3}	2.5
Puerto Gaitán	530	8.0	10^{-2}	0.8
Sabanalarga	501	3.0	10^{-2}	0.3
Tuta	544	35.0	10^{-4}	350
Tota	500	2.5	10^{-5}	250
Villapinzón	533	17.5	10^{-4}	175

* Dilución menos concentrada donde los cinco tubos dieron positivo

Tabla 9. Densidad de poblaciones de bacterias oxidadores de nitrito en los suelo

MUNICIPIO	No. Característico	No. Más Probable	Dilución*	No. De Células / gr. de suelo ($\times 10^4$)
Cocorná	522	9.5	10^{-4}	9.5
Cunday	511	4.5	10^{-4}	4.5
Pasto	500	2.5	10^{-5}	25
Puerto Wilches	521	7.0	10^{-2}	0.07
Puerto López	541	17.0	10^{-5}	170
Puerto Gaitán	531	11.0	10^{-4}	11
Sabanalarga	541	17.0	10^{-3}	1.7
Tuta	533	17.5	10^{-3}	1.75
Tota	511	4.5	10^{-4}	4.5
Villapinzón	522	9.5	10^{-4}	9.5

* Dilución menos concentrada donde los cinco tubos fueron positivos

Las poblaciones de las muestras del altiplano cundiboyacense mostraron una mayor densidad de oxidadores de amonio, frente a las de oxidadores de nitrito;

contrario a las demás donde fue mayor para los últimos; también se puede observar que Tuta presenta la mayor población de oxidadores de amonio y la menor población de oxidadores de nitrito, mientras que Villapinzón muestra la menor población de oxidadores de amonio y la mayor población de oxidadores de nitrito; ente tanto Tota presenta poblaciones intermedias entre las tres (Tablas 8 y 9).

En la zona de los llanos orientales se observa que las mayores poblaciones tanto de oxidadores de amonio como de oxidadores de nitrito se encuentran en Puerto López y disminuyen respectivamente en Puerto Gaitán y Sabanalarga (Tablas 8 y 9).

Esta prueba es una de las primeras aproximaciones acerca de la densidad de población de bacterias nitrificantes en un suelo; no se puede decir exactamente cual es la población ya que se presenta mucha incertidumbre puesto que los organismos son susceptibles a la influencia de factores climáticos, edáficos, antropogénicos y por la disponibilidad de alimento, todo se aproxima a lo que en realidad sucede en el suelo. Con el método del número más probable, cuando un tubo da positivo, no se sabe si la transformación fue a partir de una célula ó por la actividad de una colonia de bacterias; además, en el momento de preparar las diluciones influyen el tiempo y la fuerza de agitación que hacen que la disgregación del suelo sea lo suficiente para que las bacterias se disocien e inclusive durante la agitación se pueden morir muchos individuos, por lo tanto los

resultados obtenidos pueden ser mucho menores de lo que en realidad sucede en el suelo.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS NITRIFICANTES

En todos los suelos, en los medios para oxidadores de amonio, se encontraron cadenas de bacterias en forma de cocos (Figura 7), demostrándose que es un solo género que trabaja en los suelos ácidos transformando amonio en nitrito, estas bacterias dieron una reacción gram negativa y de acuerdo a comparaciones con fotografías de los oxidadores de nitrito conocidos (Anexo J) se identificaron como el género *Nitrosococcus*, diferente a los nitrificantes más conocidos que trabajan en los suelos de zonas templadas, demostrándose así que en zonas tropicales que presentan suelos con problemas de acidez se han adaptado otros organismos que no son los más ampliamente distribuidos en otras latitudes donde no hay estas mismas características en los suelos.

En los tubos con medio para oxidadores de amonio, se encontraron bacterias gram negativas con formas de bacilos (Figura 8) que fueron identificadas como género *Nitrobacter* las cuales si corresponden a los oxidadores de nitrito más conocidos en otras zonas y que se han adaptado a las condiciones de acidez de los suelos del territorio colombiano.

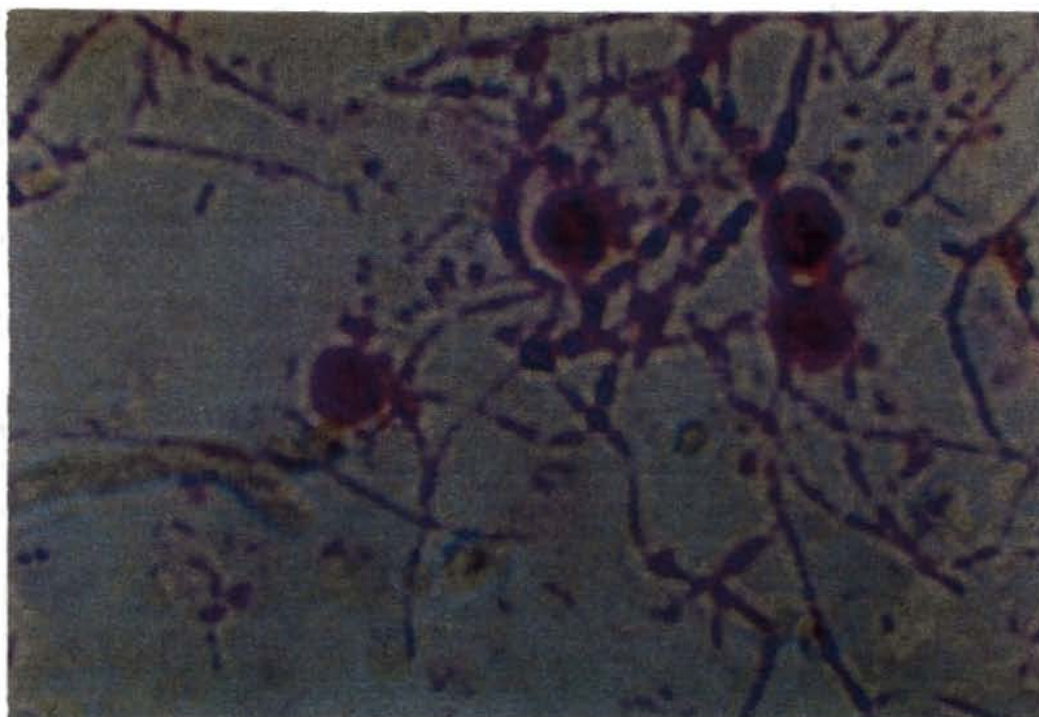


Figura 7. Bacterias oxidadoras de amonio encontradas; observe las cadenas de cocos correspondientes al género *Nitrosococcus*.

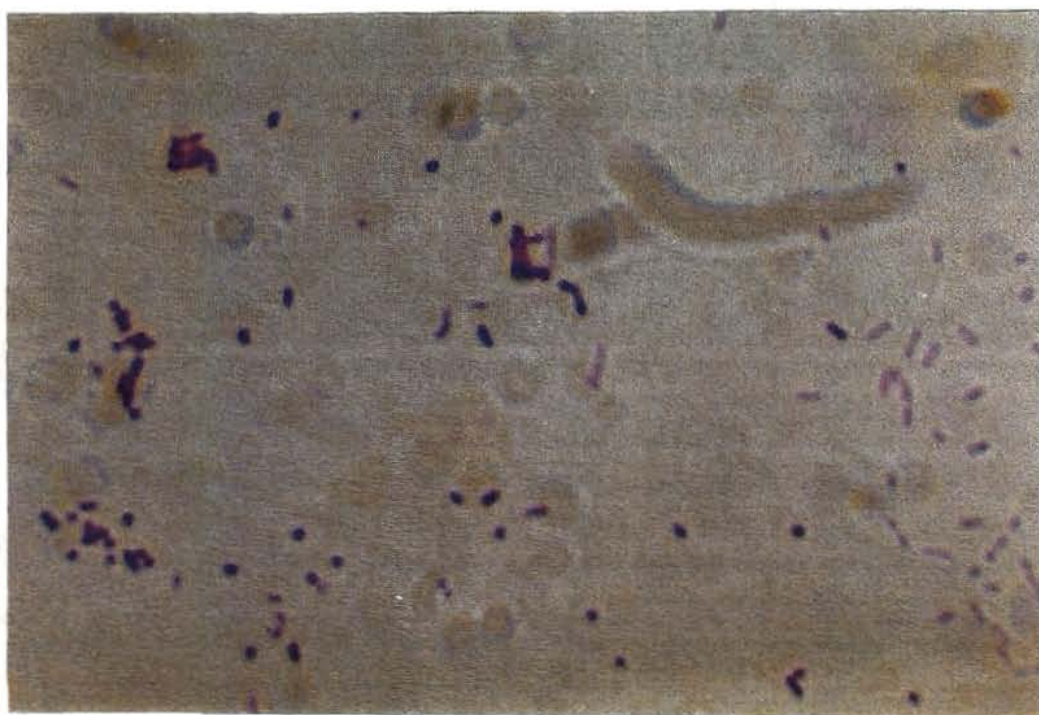


Figura 8. Bacterias oxidadoras de nitrito encontradas; observe la forma de baciles correspondiente al genero *Nitrobacter*

CONCLUSIONES

En todos los suelos ácidos estudiados hubo nitrificación.

Se encontraron densidades de poblaciones de bacterias oxidadoras de amonio que van desde 0.25×10^3 individuos / g de suelo en Cocorná y Puerto López hasta 350×10^2 individuos / g de suelo en Tuta. Y densidades de poblaciones de bacterias oxidadoras de nitrito que van desde 0.07×10^4 individuos /g de suelo en Puerto Wilches hasta 170×10^4 individuos / g de suelo en Puerto López.

Los organismos que participan en este proceso, son bacterias gram negativas, con forma de cocos que oxidan amonio a nitrito, identificadas como *Nitrosococcus* y con formas de bacilos que oxidan nitrito a nitrato, identificadas como *Nitrobacter*.

Existe el riesgo de pérdida de nitrógeno del suelo y contaminación de las aguas debido a la actividad nitrificante de estas bacterias.

Como no hay excepción en ninguna muestra, a pesar de climas y lugares diferentes, es muy probable que estas conclusiones valen para todos los suelos ácidos del territorio colombiano y tal vez de la zona andina tropical suramericana.

RECOMENDACIONES

El análisis de los resultados de este trabajo permite hacer las recomendaciones siguientes:

Realizar trabajos más profundos, para hacer una identificación y caracterización completas de las bacterias nitrificantes encontradas en los suelos ácidos estudiados.

Extender esta investigación a los suelos ácidos tropicales de otros países de américa y otros continentes

Determinar el pH mínimo hasta el cual ocurre el proceso de la nitrificación en los suelos ácidos.

Evaluar la nitrificación heterotrofa en los suelos ácidos.

Estudiar la influencia de los suelos con diferente fuente de acidez, respecto a su mineralogía, naturaleza y calidad de la materia orgánica, cantidades de aluminio de cambio, niveles de fósforo y contenidos de bases, sobre el comportamiento de la nitrificación en los suelos ácidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALLEMAN. 1996. Behavior and Physiology of Nitrifying Bacteria. File:A:/nitrifier-behavior.htm

ANDERSON, I. C. Et al. 1993. A Comparison of NO and N₂O Production by the Autotrophic Nitrifier *Nitrosomonas europaea* and Heterotrophic Nitrifier *Alcaligenes faecalis*. In: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59, No. 11 (Nov.); p. 3525 – 3533.

ARANA, Mario. 1971. Respuesta al Encalado de un Suelo Derivado de Ceniza Volcánica. Cambios en el pH y la Nitrificación. En: Suelos Ecuatoriales Vol. III, Nº 1. (Junio); p. 156 – 169.

BROCK, T. D. et al. 1994. Biology of Microorganism. Seventh Edition. New Jersey: Prentice Hall. 909 p.

BURBANO, O. H. 1989. El Suelo Una Visión sobre sus componentes Biorgánicos. Pasto : Universidad de Nariño. P. 306 – 310. Serie Investigaciones, No. 1.

CAMEAN, Ana; et al. 1995. Toxicología Avanzada. Madrid : Manuel Repetto; p. 267 – 270.

ENCICLOPEDIA SALVAT DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA. 1964. Barcelona: Salvat Editores. Vol. 2; p. 699-670.

GARAVITO, Fabio. 1979. Propiedades Químicas de los Suelos. Bogota D.E: IGAC. p. 221 –240.

GRAHAM, Peter. 1972. El Ciclo del Nitrógeno. En: Suelos Ecuatoriales : El Uso del Nitrógeno en el Trópico. Vol. 4, No. 1 (Julio); p. 119 – 127.

GUERRERO, Ramiro. 1995. La Acidez del Suelo, su Naturaleza, sus Implicaciones y su Manejo. En: Memorias del Seminario Taller: Fundamentos para la Interpretación de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas para Riego. Segunda Edición. Santafé de Bogotá: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo; p. 141 – 155.

HANKE, Franz. 1995. Los Elementos Mayores N, P, K en el Suelo. : Memorias del Seminario Taller: Fundamentos para la Interpretación de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas para Riego. Segunda Edición. Santafé de Bogotá: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo; p. 186 – 190

HYMAN, Michael.; et al. 1995. Inhibition, Inactivation and Recovery of Ammonia Oxidizing Activity in Cometabolism of Trichloroethylene by *Nitrosomonas europaea*. In: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61, No. 4 (April); p. 1480 – 1487.

IGAC. 1980a. Estudio General de los Suelos de los Municipios de Aquitania, Cultiva, Firavitoba, Iza, Mongui, Nobsa, Sogamoso, Tibasosa, Tópaga y Tota (Departamento de Boyacá). Bogotá D. E.: IGAC, Subdirección Agrológica; p. 281-283, 287, 333, 336-341, 345, 351-355.

_____ 1980b. Estudio General de Suelos de los Municipios de Barrancabermeja, Puerto Wilches, Sabana de Torres y San Vicente de Chucurí (Departamento de Santander). Bogotá D. E.: IGAC, Subdirección Agrológica, p. 278, 297-299, 313, 319-321, 327, 344-347, 351, 378.

_____ 1972. Estudio General, para Fines Agrícolas, de los Municipios de Tuta, Toca, Cómbita y Sotaquirá (Departamento de Boyacá). Bogotá D. E.: IGAC, Dirección Agrológica. Vol. 8. No. 1; p. 22 – 24, 28 – 34, 52 – 59, 76 – 78, 101 – 104, 125 – 127.

_____ 1979. Suelos del Departamento de Antioquia. Bogotá D. E.: IGAC, Subdirección Agrológica. Tomo 2.

JULIETTE, L; HYMAN, M. And ARP, D. 1993. Mechanism Based Inactivation of Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by Allylsulfide. In: *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, No. 11 (Nov.); p. 3728-3735.

MAYEA, S.; NOVO, R. y VALIÑO, A. 1982. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, p. 51-59.

QUASTEL, J. H. 1947. El Metabolismo del Nitrógeno en el suelo. En: *Endeavour*. Vol. 6, No. 23(Julio), p. 129-134.

RAMADE, F. 1977. *Elementos de Ecología Aplicada*. Trad. del francés por J. E. Hernández y H. Sainz. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; p. 173-179, 246-254.

RUSSELL, J. y RUSSELL, W. 1968. *Las Condiciones del Suelo y el Crecimiento de las Plantas*. Cuarta Edición. Trad. del Inglés por Gaspar González y González. Madrid: Aguilar; p. 21-26, 342-357.

SALISBURY, F. y ROSS, C. 1996. *Fisiología Vegetal*. Trad. del Inglés por Virgilio González. México: Grupo Editorial Iberoamérica; p.319-321.

SCHMIDT, E. L. and BELSER, L. W. 1982. *Nitrifying Bacteria*. In: *Methods of Soil Analysis Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. Second Edition. Madison: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, p. 1027-1043.

SEOANEZ, M. 1977. La Contaminación Agraria. Madrid: Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (España); p. 279-280.

STANIER, Roger et al. 1996. Microbiología. Segunda Edición. Barcelona: Editorial Reverté; p. 411-413, 591.

TEUSCHER, H. y ADLER, R. 1985. El Suelo y su Fertilidad. Novena Impresión. México: Compañía Editorial Continental, p. 140, 238 – 240.

TISDALE, S. y NELSON, W. 1991. Fertilidad de los Suelos y Fertilizantes. México: Editorial Limusa, p. 150-165, 195-197.

VANNELLI, T. and HOOPER, A. 1993. Reductive Dehalogenation of the Trichloromethyl Group of Nitrapyrin by the Ammonia Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas europea*. In: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 59, No. 11 (Nov.); p. 3597-3601.

ANEXOS

Anexo A: Preparación de la Solución de Tromsdorf.

1. Añadir lentamente, con agitación constante, 100 ml. de una solución acuosa al 20% de Cl_2Zn hirviendo, a una mezcla de cuatro gr. de almidón en 150 ml. de agua. Continuar calentando hasta que se disuelva el almidón tanto como sea posible y la solución este prácticamente clara.
2. Diluir con agua destilada y añadir dos gr. bien de yoduro de zinc, bien de yoduro potásico
3. Diluir hasta un litro, filtrar y almacenar en botellas bien tapadas en un lugar oscuro.

ANEXO B. Tabla de Mac Crady para 5 tubos por dilución para enumeración de bacterias.

Número Característico	Número de Bacterias	Número Característico	Número de Bacterias	Número Característico	Número de Bacterias	Número Característico	Número de Bacterias
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.0	420	2.0	530	8.1
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	1.0	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	0.8	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	1.0	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.1	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

Tomado de: Mayea et al., 1982

Anexo C: Volumen y promedios de NaOH 0.01 N gastados en las titulaciones para las valoraciones de nitrógeno amoniacal en suelos sin adición de sulfato de amonio.

Nº	SUELO LUGAR	Titulación Inicial (0)			Segunda Titulación (1)			Tercera Titulación (2)			Cuarta Titulación (3)			Titulación Final (4)		
		NaOH 0.01 N ml.	Prome- dio	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml.	Prome- dio	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml.	Prome- dio	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml.	Prome- dio	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml.	Prome- dio	N-NH ₄ ppm
1	Cocorná	1.2	0.85	29.76	0.7	0.60	21.02	0.5	0.40	14.00	0.4	0.30	10.50	0.4	0.30	10.5
2	Cocorná	0.5			0.5			0.3			0.2			0.2		
3	Cunday	0.5	0.40	14.00	0.3	0.35	12.26	0.3	0.25	8.75	0.2	0.20	7.00	0.3	0.25	8.75
4	Cunday	0.3			0.4			0.2			0.2			0.2		
5	Pasto	1.3	1.35	47.27	1.2	0.90	31.52	0.9	0.80	28.01	1.3	1.05	36.77	1.1	1.05	36.77
6	Pasto	1.4			0.6			0.7			0.8			1.0		
7	Puerto Gallán	1.2	1.05	36.77	1.3	1.45	50.78	1.2	1.25	43.77	2.1	1.35	47.27	1.9	1.90	66.53
8	Puerto Gallán	0.9			1.6			1.3			0.6			1.9		
9	Puerto López	1.4	1.35	47.27	1.1	1.30	42.52	1.0	1.20	42.02	1.3	1.25	43.77	1.5	1.40	49.03
10	Puerto López	1.3			1.5			1.4			1.2			1.3		
11	Puerto Wilches	0.8	1.25	43.77	1.1	1.35	47.27	0.9	0.90	31.52	1.2	1.60	56.03	1.4	1.85	64.78
12	Puerto Wilches	1.7			1.6			0.9			2.0			2.3		
13	Sabanalarga	1.5	1.40	49.03	2.1	1.85	64.78	1.0	0.95	33.27	2.3	2.05	71.77	2.1	2.10	73.54
14	Sabanalarga	1.3			1.6			0.9			1.8			2.1		
15	Tota	1.4	1.20	42.02	0.8	0.70	24.51	0.2	0.35	12.26	1.1	0.95	33.27	0.4	0.60	21.01
16	Tota	1.0			0.6			0.5			0.8			0.8		
17	Tuta	1.8	1.95	68.29	0.8	0.95	33.27	0.5	0.70	24.51	0.7	1.10	38.52	0.8	1.15	40.27
18	Tuta	2.1			1.1			0.9			1.5			1.5		
19	Villapinzón	2.8	2.45	85.76	2.0	1.75	61.28	0.8	0.75	26.26	1.5	1.15	40.27	1.2	1.00	35.02
20	Villapinzón	2.1			1.5			0.7			0.8			0.8		

Titulación Inicial: Octubre 19 de 1998

Segunda Titulación: Octubre 26 de 1998

Tercera Titulación: Noviembre 3 de 1998

Cuarta Titulación: Noviembre 10 de 1998

Titulación Final: Noviembre 17 de 1998

Anexo D: Volumen y promedios de NaOH 0.01 N gastados en las titulaciones para las valoraciones de nitrógeno amoniacal en suelos con adición de sulfato de amonio.

Nº	SUELO LUGAR	Titulación Inicial (0)			Segunda Titulación (1)			Tercera Titulación (2)			Cuarta Titulación (3)			Titulación Final (4)		
		NaOH 0.01 N ml	Prome- do	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml	Prome- do	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml	Prome- do	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml	Prome- do	N-NH ₄ ppm	NaOH 0.01 N ml	Prome- do	N-NH ₄ ppm
1	Cocorná	13.3	12.25	428.97	5.0	5.65	197.85	5.0	4.75	166.34	17.5	15.85	555.04	17.4	16.25	516
2	Cocorná	11.2			6.3			4.5			14.2			15.1		
3	Cunday	13.5	10.75	376.44	6.1	4.80	168.09	5.8	5.35	187.35	20.4	16.40	574.25	18.5	15.60	541.25
4	Cunday	8.0			3.5			4.9			12.4			12.7		
5	Pasto	14.2	11.60	406.21	4.8	4.85	164.84	5.2	5.35	187.35	12.8	15.40	539.29	13.0	14.40	504.26
6	Pasto	9.0			4.9			5.5			18.0			15.8		
7	Puerto Gaitán	10.6	12.05	421.97	5.2	4.95	175.34	5.4	4.65	162.83	13.0	15.85	555.04	15.5	14.55	534.51
8	Puerto Gaitán	13.5			4.7			3.9			18.7			13.6		
9	Puerto López	17.5	9.10	316.66	4.9	4.15	145.32	4.2	3.70	129.57	14.7	14.25	499.00	15.0	13.70	462.24
10	Puerto López	5.7			3.4			3.2			13.8			11.4		
11	Puerto Wilches	6.0	6.35	222.36	3.0	3.05	106.80	2.8	3.45	120.81	10.2	12.85	419.58	8.5	10.50	374.09
12	Puerto Wilches	6.7			3.1			4.1			15.5			12.5		
13	Sabanalarga	12.8	11.65	407.96	4.6	4.05	141.82	4.6	3.90	136.57	18.8	14.75	516.52	14.6	15.70	549.78
14	Sabanalarga	10.5			3.5			3.2			10.7			16.8		
15	Tota	10.2	9.45	330.92	3.8	4.30	150.58	3.7	3.85	134.82	11.2	11.05	386.95	14.7	13.10	456.24
16	Tota	8.7			4.8			4.0			10.9			11.5		
17	Tuta	16.1	12.95	453.48	5.2	5.20	182.09	5.0	4.65	162.83	26.4	21.45	751.14	26.5	21.35	747.65
18	Tuta	9.8			5.2			4.3			16.5			16.2		
19	Villapinzón	7.9	8.45	295.90	3.0	8.25	288.90	3.5	3.75	131.32	12.6	12.90	451.71	7.5	9.15	320.41
20	Villapinzón	9.0			5.5			4.0			13.2			10.8		

Titulación Inicial: Octubre 19 de 1998

Segunda Titulación: Octubre 26 de 1998

Tercera Titulación: Noviembre 3 de 1998

Cuarta Titulación: Noviembre 10 de 1998

Titulación Final: Noviembre 17 de 1998

Anexo E: Lectura en el reflectómetro (R-Q Flex Merck) y promedios de las cantidades de nitrógeno nítrico en los suelos sin adición de amonio.

SUELO		Lectura Inicial (0)		Segunda Lectura (3)			Lectura Final (4)			
		mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)	mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)	mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)
Nº	LUGAR									
1	Cocorná	45	41.5	28.12	27.0	91.49	33	33.5	113.51	
2	Cocorna	38		28		34				
3	Cunday	58	58.5	39.65	33.5	113.51	46	48.0	164.34	
4	Cunday	59		31		50				
5	Pasto	49	47.5	32.19	20.5	69.49	24	25.5	86.41	
6	Pasto	46		19		27				
7	Puerto Gaitán	27	25.5	17.28	8.0	27.11	9	10.0	33.89	
8	Puerto Gaitán	24		7		11				
9	Puerto López	14	14.5	9.83	9.0	30.50	14	11.0	37.27	
#	Puerto López	15		8		8				
#	Puerto Vilches	5	5.0	3.39	4.0	13.55	15	10.0	33.89	
#	Puerto Vilches	5		5		5				
#	Sabanalarga	33	33.5	22.70	9.0	30.50	10	9.5	32.19	
#	Sabanalarga	34		9		9				
#	Tota	33	34.5	23.38	31.0	105.04	33	34.0	115.21	
#	Tota	36		34		35				
#	Tuta	22	28.5	19.31	28.0	94.88	39	28.0	94.88	
#	Tuta	35		22		17				
#	Villapinzón	65	59.0	39.98	40.0	135.54	68	61.5	208.39	
#	Villapinzón	53		44		55				

Lectura Inicial: Octubre 20 de 1998

Segunda Lectura: Noviembre 13 de 1998

Lectura Final: Noviembre 18 de 1998

Anexo F: Lectura en el reflectómetro (R-Q Flex Merck) y promedios de las cantidades de nitrógeno nítrico en los suelos con adición de amonio.

SUELO		Lectura Inicial (0)			Segunda Lectura (3)			Lectura Final (4)		
		mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)	mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)	mgr./lt.	Promedio	N-NO ₃ (ppm)
Nº	LUGAR									
1	Cocorná	36	38.5	24.74	24	21.5	72.85	16	14.0	47.44
2	Cocorná	37			19			12		
3	Cunday	52	51.5	34.90	41	44.5	150.79	38	38.5	130.46
4	Cunday	51			48			39		
5	Pasto	49	48.5	32.87	37	31.0	105.04	20	18.5	62.69
6	Pasto	48			25			17		
7	Puerto Gaitán	31	32.0	21.89	8	8.5	28.80	7	6.5	22.03
8	Puerto Gaitán	33			9			6		
9	Puerto Lopez	21	23.0	15.59	7	7.5	25.41	5	5.0	16.94
#	Puerto López	25			8			5		
#	Puerto Wilches	9	8.0	4.07	5	4.5	15.25	3	2.5	8.47
#	Puerto Wilches	3			4			2		
#	Sabanalarga	39	42.5	28.80	9	10.0	33.89	6	5.0	20.33
#	Sabanalarga	46			11			6		
#	Tota	49	46.5	31.51	15	14.5	49.13	14	13.5	45.74
#	Tota	44			14			13		
#	Tuta	34	32.0	21.89	15	13.5	45.74	13	12.0	40.66
#	Tuta	30			12			11		
#	Villapinzón	82	63.5	43.03	77	76.5	259.22	62	68.0	230.42
#	Villapinzón	65			76			74		

Lectura Inicial: Octubre 20 de 1998

Segunda Lectura: Noviembre 13 de 1998

Lectura Final: Noviembre 18 de 1998

Anexo G. Tubos positivos de oxidadores de amonio.

a. Municipio de Cocorná. Número característico 500.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	O	O							
2	+	+	/							
3	+	+	O							
4	+	+	O							
5	+	O	/							
Total tubos positivos	5	5	5	-	-	-	-	-	-	-

b. Cunday. Número característico 530.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	O	/							
2	+	+								
3	+	+	/							
4	+	+								
5	+	+	/							
Total tubos positivos	5	5	3	-	-	-	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

O observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

c. Pasto. Número característico 500.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+								0
2	+	+				0				
3	+	+								
4	+	+								
5	+	+								
Total tubos positivos	5	5	-	-	-	1	-	-	-	1

d. Puerto Gaitán. Número característico 530.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	0							
2	+	+								
3	+	0								
4	+	+	0							
5	+	+	0							
Total tubos positivos	5	5	3	-	-	-	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

0 observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

e. Puerto López. Número característico 500.

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Repetición										
1	+	+	O							
2	+	+	+							
3	+	+	+							
4	+	+	+					/		/
5	+	+	+							
Total tubos positivos	5	5	5	-	-	-	-	1	-	1

f. Municipio de Pto. Wilches. Número característico 510.

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Repetición										
1	+	O	/							
2	+	O								
3	+	+								
4	+	+								
5	+	+								
Total tubos positivos	5	5	1	-	-	-	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación

O observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

g. Municipio de Sabanalarga. Número característico 501.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+								
2	+	+								
3	+	+								
4	+	+		/						
5	+	O								
Total tubos positivos	5	5	-	1	-	-	-	-	-	-

h. Municipio de Tota. Número característico 500.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+	O	/					
2	+	+	+	O	/					
3	+	O	+	+	O					
4	+	+	+	+	/					
5	+	+	+	O	/					
Total tubos positivos	5	5	5	5	5	-	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

O observación al final de la quinta semana de incubación

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

i. Municipio de Tuta. Número característico 544.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	O	/						
2	+	O	/	O	O	O				
3	+	O	O	O	O	O				
4	+	O	/	/	O	O				
5	+	O	/	/	O	O				
Total tubos positivos	5	5	5	5	4	4	-	-	-	-

j. Municipio de Villapinzón. Número característico 533.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+	+		O				
2	+	+	+	O	/	O		O		
3	+	+	+	O	/	O			/	
4	+	+	+	+	/					
5	+	+	+	+						
Total tubos positivos	5	5	5	5	3	3	0	1	1	0

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

O observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

Anexo H. Tubos positivos de oxidadores de nitrito.

a. Cocorná. Número característico 522.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+	+	+	+				
2	+	+	+	0						
3	+	+	+	+						
4	+	+	+	0						
5	+	+	+	0	0	+			0	
Total tubos positivos	5	5	5	5	2	2	-	-	1	-

b. Cunday. Número característico 511.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	0	/						
2	+	+	0	0	/					
3	+	+	+	/						
4	+	+	0	0		/				
5	+	+	+	/						
Total tubos positivos	5	5	5	5	1	1	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación

0 observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

c. Pasto. Número característico 500.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	0	/	/					/
2	+	+	0	/	0					
3	+	+	0	/	/					
4	+	+	0	/	/			/		
5	+	+	0	0	/					
Total tubos positivos	5	5	5	5	5	-	-	1	-	1

d. Puerto Gaitán. Número característico 531.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	/	/	0	+				
2	+	+	/	/						
3	+	+	+	/	/		/	/		
4	+	+	+	/						
5	+	+	/	/	/					
Total tubos positivos	5	5	5	5	3	1	1	1	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

0 observación al final de la quinta semana de incubación

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

e. Puerto López. Número característico 541.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+	+	0	0	0			
2	+	+	+	+	/					0
3	+	+	+	+	0	0				
4	+	+	+	+	0	0				0
5	+	+	+	+	/	/				
Total tubos positivos	5	5	5	5	5	4	1	-	-	2

f. Puerto Wilches. Número característico 521.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+				0	0		
2	+	+								
3	+	+		0						
4	+	+	/			/				
5	+	+				/				
Total tubos positivos	5	5	2	1	-	2	-	1	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

0 observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

g. Sabanalarga. Número característico 541.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+	+		0				
2	+	+	+	+						
3	+	+	+	0			0			
4	+	+	+	0			0			
5	+	+	+		0	/				
Total tubos positivos	5	5	5	4	1	2	2	-	-	-

h. Tota. Número característico 511.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	0	0	0	0						
2	0	0	0	0		0				
3	0	0	0	0						
4	0	0	0	0	/					
5	+	0	0	0						
Total tubos positivos	5	5	5	5	1	1	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

0 observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

i. Tuta. Número característico 533.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	+	+							
2	+	+	+		0					
3	+	+	+	+	+					
4	+	+	+	0						
5	+	+	+	0	/					
Total tubos positivos	5	5	5	3	3	-	-	-	-	-

j. Villapinzón. Número característico 522.

Dilución \ Repetición	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	+	0	0	0	0	0				
2	+	+	0	0						
3	+	0	0	0	0					
4	0	0	0	0						
5	0	0	0	0		/				
Total tubos positivos	5	5	5	5	2	2	-	-	-	-

+ observación al final de la cuarta semana de incubación.

0 observación al final de la quinta semana de incubación.

/ observación al final de la sexta semana de incubación.

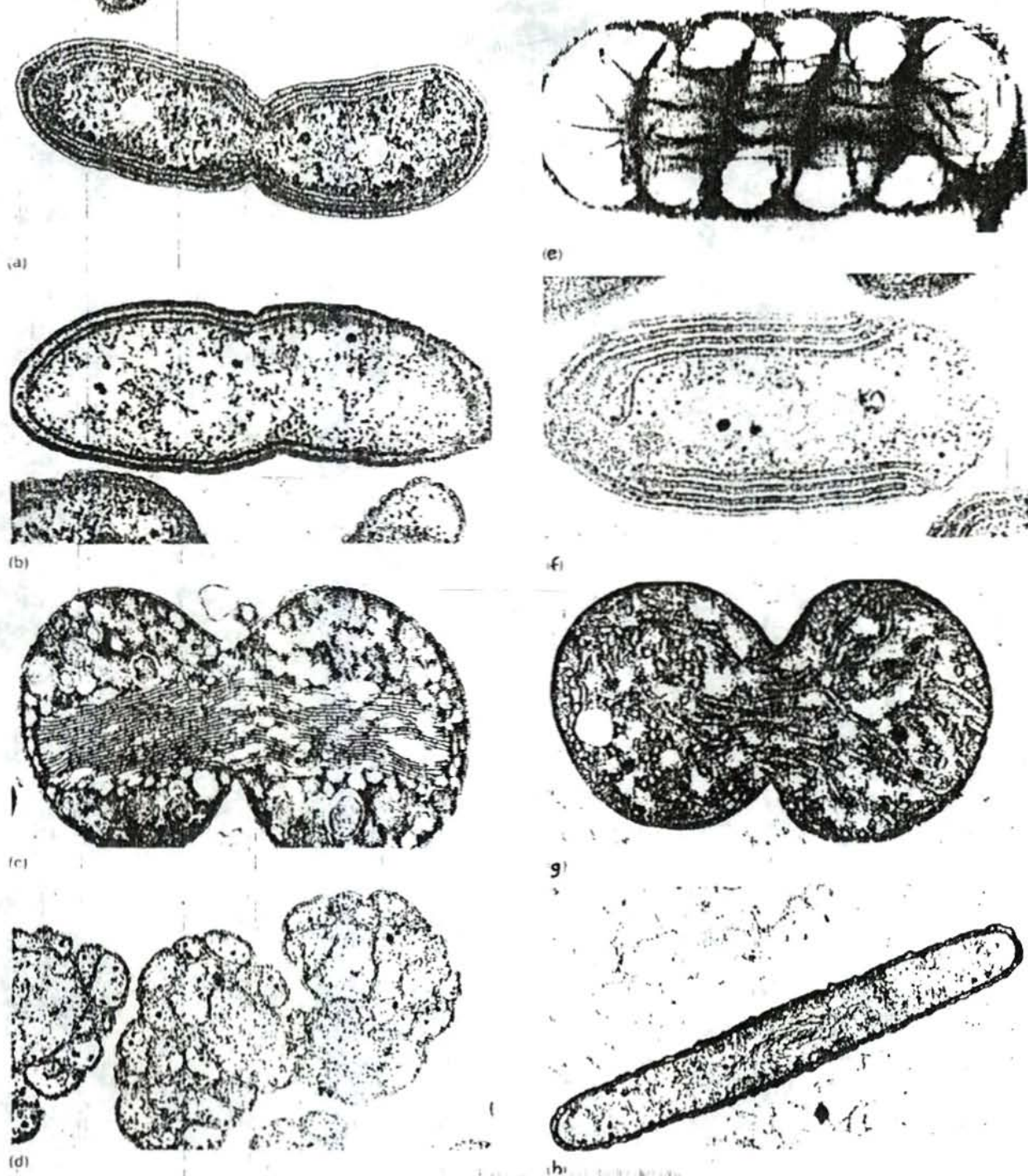


FIGURA 16.1

Micrografías electrónicas de cortes finos de bacterias nitrificantes. (a) *Nitrosomonas europaea* (X 32 500). (b) *Nitrosomonas* sp. (X 39 600). (c) *Nitrosocystis oceanus* (X 23 300). (d) *Nitrosolobus multiformis* (X 22 000). (e) *Nitrosospira briensis* (X 35 300). (f) *Nitrobacter winogradskyi* (X 63 200). (g) *Nitrococcus mobilis* (X 21 000). (h) *Nitrospira gracilis* (X 37 500). Tomado de S. W. Watson y M. Mandel. «Comparison of the Morphology and Deoxyribonucleic Acid Composition of 27 Strains of Nitrifying Bacteria». *J. Bacteriol.* 107, 563 (1971).

