

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Prof. Dr. V. CALLAO

“LA NITRIFICACION EN LOS SUELOS ARIDOS”*

por

C. PÉREZ MIRANDA

Ars. Pharm. XI, 63 (1970)

Un conocimiento racional del suelo, permite un aprovechamiento adecuado del mismo. El estudio científico del suelo es, por tanto, la base para su mejor rendimiento agrícola.

De todos los ciclos biogénéticos que se desarrollan en un suelo, el del nitrógeno es, quizás, el más fundamental, porque siendo pequeña su cantidad las cosechas anualmente necesitan extraer un elevado porcentaje. Tan sólo el 0'00001 al 0'001 por ciento del nitrógeno total de la biosfera es asequible para el crecimiento de las plantas ya que la mayoría de ellas sólo pueden usarlo si está en forma de nitratos o amoníaco. La casi totalidad del nitrógeno naturalmente introducido en el suelo, lo está en forma orgánica, proteica, y ha de ser mineralizado, siendo el primer término de estas reacciones la formación de amoníaco. Este nitrógeno amoniacal es después oxidado a nitritos y nitratos, siendo de esta forma asimilado por las plantas.

El poder amonificante de un suelo viene dado por la cantidad total de amoníaco liberado por la flora amonificante de un suelo enriquecido con nitrógeno orgánico. Para estudiar la dinámica de la amonificación se enriquece la tierra problema con una sustancia proteica más o menos compleja y se sigue la formación y liberación de amoníaco. ¿Qué sustancia escoger. Fremmer (1950) demostró que en los hidrolizados de materia orgánica del suelo había una serie de aminoácidos que, identificados por cromatografía en papel, resultaron ser: treonina, serina, leucina, prolina, tirosina, lisina, etc., es decir, los aminoácidos más corrientes. Simonart y Peeters (1954) dan como constantes siempre: el ácido aspártico, glutámico, serina, alanina. Muy frecuentes: glicina, leucina, valina, glutamina. Más raros: lisina, fenil-alanina, prolina, treonina, y ácido amino butírico. Esta gran diversidad autorizada a experimentar con sustancias sin especificidad particular.

* Extract de la TESIS DOCTORAL de la Licenciada en Farmacia doña C. Pérez Miranda, dirigida por el Prof. Dr. V. Callao Fabregat, y calificada de “SOBRESALIENTE CUM LAUDE”.

El proceso de la amonificación está influenciado por diversos factores ambientales, especialmente por la humedad. Loehnis y Green ensayaron tres valores de humedad: 40, 70 y 100 por ciento, llegando a la conclusión de que el fenómeno es esencialmente aerobio pues, a saturación, la amonificación es muy débil. Coppier y Pochon (1952) experimentan valores más bajos de humedad: 10, 20 y 40 por ciento. Las curvas que obtuvieron difieren en su forma según las tasas de humedad. Los resultados más fieles se obtienen para el valor del 20 por ciento. Con el 10 y el 40 por ciento se obtuvieron curvas bastantes irregulares, esto parece indicar que los valores óptimos son los intermedios. Cosa lógica, ya que se trata de un proceso realizado por bacterias aerobias

Los microorganismos responsables de la amonificación son muy diversos. Se puede jugar la actividad global de esta microflora amonificante por el procedimiento seguido por Barjac y Pochon (1953) consistente en sembrar suspensiones-diluciones de la tierra problema en un medio líquido en donde la única fuente de nitrógeno y de carbono es la tirosina. Se observa la desaparición de la tirosina con el reactivo de Millón en medio acético. De esta forma llegan a la conclusión de que la fertilidad de un suelo está muy relacionada con la actividad de la microflora aminoficante. En las tierras ricas de jardín esta actividad es bastante elevada, siendo mínima en los Mor frestaes y en las turbas ácidas. Es muy difícil, con el estado actual de técnicas y de conocimientos, determinar los microorganismos constituyentes de la microflora amonificante. Para algunos autores (Waksman, Starkey) la amonificación es un proceso sin ninguna actividad, considerando, como microorganismos amonificantes a todas las bacterias, actinomicetos y hongos que en cultivos puros liberan amoníaco por ataque de sustancias proteicas.

Una parte del nitrógeno amoniacal liberado en el proceso de la amonificación es, si las circunstancias son apropiadas, oxidado a nitratos, siendo de esta forma asimilado por la mayoría de los vegetales superiores. La fertilidad de una tierra está determinada por su contenido en nitratos. Fue en 1865 cuando los investigadores de la escuela francesa establecieron, contrariamente a la teoría amoniacal de Liebig, la gran importancia de los nitratos para las plantas y, por tanto, para la fertilidad de los suelos. En 1891 Warington y Frakland demostraron que, el proceso se realiza en dos tiempos: oxidación de amoníaco a nitritos por la acción de los microorganismos del grupo Nitrosomonas, y oxidación de los nitritos a nitratos por la acción de los Nitrobacter. Lipman (1912) vio que tanto las bacterias nitrosas como las nítricas se encuentran presentes en todos los suelos normales y no están muy ausentes en los muy ácidos, como los Mor forestales y ciertas turbas. Predominan en los horizontes superficiales y en los medios. Su repartición en los suelos viene también condicionada por el pH de los mismos, Wilson (1927) dio como valor más óptimo de pH el de 7, pues mientras que para un valor de $\text{pH}=6.2$ encontró 11.000 bacterias por gramo de tierra, para un $\text{pH} = 7$ hay 55.000 bacterias por gramo.

Coppier y Barjac (1952) determinaron la actividad nitrificante de los suelos mediante una valoración cuantitativa, buscando la dosis de nitratos aparecidos en un medio amoniacal sembrado con una cantidad determinada de tierra. El criterio seguido por Kauffman y Boquel (1951) fue distinto, pues, consistió en

buscar el porcentaje de granos de tierra fértiles. El método tiene numerosos inconvenientes que pueden inducir fácilmente a error. Más exacto es el procedimiento seguido por Pochon y Tardieux (1962) consistente en valorar separadamente la actividad nitrosa y nítrica del suelo problema, sembrando para ello con suspensiones-diluciones de tierra los medios electivos líquidos. Para los gérmenes nitrosos utilizan sulfato amónico como fuente de nitrógeno y para los nítricos emplean nitrato sódico.

El contenido de los suelos en nitratos es muy variable y depende de diversos factores, pero su valor es siempre no muy alto. En los suelos muy ácidos los valores son muy pequeños, aunque el contenido en amoníaco es más importante. Las estaciones del año parecen tener una influencia directa en las tasas de nitratos. Para algunos autores (Thorton y Gray) la acumulación parece ser mayor primavera, y en verano. Otros (Verona y Paci) señalan el otoño como la época en profundidades comprendidas entre 0'75 y 1'5 metros. A excepción de este caso en los demás suelos la acumulación es más elevada en los horizontes superiores, en los más superficiales. En tierras muy árida, los gérmenes nitrificantes encuentran las condiciones más favorables para su desarrollo en los horizontes medios, por ser allí mayor la humedad, y es por esto por lo que se encuentran aquí los mayores valores de nitratos. Este hecho indica la gran sensibilidad del proceso a la cantidad de agua y a la aireación. Traaen (1955) señala que el valor óptimo de agua corresponde a un poco después de la semisaturación.

El aislamiento de las bacterias nitrificantes es extremadamente largo y laborioso, la conservación por resiembras es bastante aleatoria a largo plazo. Winogradsky (1930) indica que los gérmenes nitrificantes constituyen un grupo poco dócil a las prácticas bacteriológicas corrientes. El problema radica en la separación de los microbios específicamente nitrificantes de toda la mezcla de gérmenes extraños que le acompañan. De todos los procedimientos, el más eficaz resulta ser el de Hoffman que emplea como sustrato la solución mineral de Winogradsky y hace varios pases en este medio por resiembras periódicas (cada tres semanas). De este medio se siembra en placa de sílico-gel impregnada de solución mineral. De las colonias así obtenidas se siembra, de nuevo, en solución mineral repartida en tubos. Para comprobar la pureza de este cultivo de gérmenes nitrificantes se siembra en varios tubos de caldo nutritivo y se observa si hay o no crecimiento en ellos.

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a los cambios de pH, Meyerhof determinó como pH óptimo para los cultivos de Nitrosomas el de 8'5-8'8 y para los Nitrobacter el de 8'3 a 9'3 Winogradsky (1933) demostró que ciertas cepas de Nitrosomonas, en su aislamiento, admitían pH diversos y los pH óptimos de crecimiento eran bajos, hasta de 6. En un trabajo posterior, Landelon y Van Tichelen (1939) demostraron la influencia del pH en la obtención de cultivos puros del *N. winogradsky*, obteniendo los siguientes resultados: para un pH 5'9 el número de Nitrosomonas era de 2'3 y el de heterotrfos contaminantes de 1. Pero para un pH 6'7 el número de Nitrosomonas es de 51'2 y el de heterotrofos de 0'2. Siendo la relación Nitrosomonas: heterotrofos de 256:1. Es decir, existen unos valores óptimos de pH a los cuales el crecimiento de los gérmenes es mayor y la cantidad de contaminantes mínima,

Los microorganismos nitrificantes son aerobios estrictos, quimiolitotrofos. Se pueden cultivar en medios estrictamente minerales, pero dado las dificultades que surgen para mantener las cepas puras en el laboratorio, hace suponer la existencia de sustancias estimulantes que faltarían en los medios estrictamente minerales del laboratorio y que, no obstante, se encuentran en los suelos. Hechos de esta naturaleza han sido ya admitidos para otros microorganismos quimiolitotrofos, tales como el *Sporovibrio desulfuricans* y el *Thiobacillus thiooxidans*.

Hay un cierto número de elementos minerales que son rigurosamente indispensables para el crecimiento de los nitrificantes, tales como el calcio (dosis óptima 1 mg. por litro), el hierro (óptimo 6 mg. por litro), el fósforo y el magnesio en cantidades trazas el cobre a dosis muy débiles; el boro, vanadio, y el litio estimulan muy ligeramente el crecimiento pero a concentraciones superiores a 0'5 por 100 (Verona).

Atendiendo a los aspectos que creemos más interesantes en el estudio del proceso de la nitrificación, hemos desarrollado las técnicas encaminadas a determinar en los suelos áridos, la potencia amonificante y nitrificante —nitrosa y nítrica— de los mismos, en función del grado de humedad de los suelos; también se ha estudiado la influencia de la época estacional y de la naturaleza preferente de los suelos en el proceso. Se ha hecho el aislamiento e identificación de los gérmenes nitrificantes, determinando los valores de pH más óptimos para el crecimiento de dichos gérmenes. Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

ACTIVIDAD AMONIFICANTE

1. En los suelos examinados la actividad es elevada.
2. La humedad del 30-35 por ciento es la óptima para la actividad amonificante del suelo. Con una humedad inferior al 10 por ciento, la actividad es muy escasa.
3. Los suelos preferentemente calizos poseen mayor capacidad aminificante.
4. No hay una relación estacional clara.
4. No hay una relación estacional clara.

ACTIVIDAD NITROSA

1. Es menor en los suelos más húmedos. El óptimo de humedad es del 12 por ciento.
2. Las tierras preferentemente calizas, secas (humedad del 7 por ciento) contienen un número de gérmenes por gramo de tierra muy elevado. Las tierras preferentemente arcillosas, con un grado de humedad del 40 por ciento contienen muy pocos gérmenes 25 gérmenes por gramo de tierra).
3. El otoño parece favorecer la actividad nitrosante, pero la influencia estacional no es muy marcada.

ACTIVIDAD NITRICA

1. Los gérmenes nítricos son menos abundantes que los nitrosos.
2. Suelos poco húmedos presentan una mayor actividad nítrica. La influencia de la humedad no es tan marcada como en la actividad nitrosa. El valor óptimo es el del 30 por ciento. Las humedades más desfavorables son a partir del 33 por ciento.
3. Ni la naturaleza preferente del suelo, ni la época estacional influyen en la actividad nitrificante.

IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS

Gérmenes nitrosos

1. Se han identificado 67 especies de "Nitrosomonas europaeae".
2. 12 especies de "Nitrosocystis javanensis".
3. 7 cepas de "Nitrosococcus nitrosus".
4. Ocasionalmente especies contaminantes del género "Corynebacterium".
5. El pH óptimo para el crecimiento de los gérmenes nitrosos es de 6'7. El intervalo de crecimiento está comprendido entre 5'5-9.

Gérmenes nítricos.

1. Se han identificado 31 gérmenes del género Nitrobacter" (especies "N. winogradsky" y N. agilis").
2. El pH óptimo para el crecimiento de los gérmenes nítricos es el de 8.
3. No se ha encontrado ninguna especie del género Nitrocystis.

BIBLIOGRAFIA

- AMER y BARTHOLOMEW.—"Influence of oxigen concentration in soil air on nitrification". Soil. Sci. 195, 191, 215.
- BREMMER.—"The amino-acid composition of the protein material in soil". Bioch. J. 1950, 47, 538.
- BARJAC y POCHON.—"Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des sols". Ann. Inst. Pasteur 1953, 85, 82.
- BARJAC.—"Denitrifying microflore its normal presence in the soil". These Doctores Sciences, 1955.
- BONAZZI.—"On Nitrification III. The isolation and Description of the Nitrite". Ferment. Bot. Gaz. 1919, 68, 194-206.
- BURRIS y WILSON.—"Biological nitrogen fixation". Ann. Rev. Biochem, 1945, 14, 685.

- COPIER y POCHON.—“Pouvoir amoifiant riel et potentiel du sol dans ses rapports avec les microfiores”. Ann. Inst. Pasteur. 1952, 201.
- COPIER y BARJAC.—“De la Richesse D'un sol en microorganismes nitrificateurs”. Ann. Inst. Pasteur 1952, 83, 118.
- CHALVIGNAC et CHALAUST.—“Recherches sur les processus biologiques d'amonification et Humification”. Ann. Inst. Pasteur 1947, 73, 1.118.
- DROUINIAU.—“Nitrification in calcareous soils”. C. R. Acad. Sc. 1948, 226, 957.
- FRAPS y STURGES.—“Effect of sun light on the nitrification of ammonium salts in soils”. Soil. Sci. 1935, 39, 85.
- FRED y DAVENPORT.—“The Effect of organic Nitrogenous Compounds on the Nitrate-forming organisms”. Soil. Sc. 1921 II, 289-407.
- HOFMAN y LEES.—“Biochemistry of the nitrifying organisms IV. Respiration and intermediary metabolism of Nitrosomonas”. Bioch. J. 1953, 54, 579.
- IMSHENECKI.—“Les cultures pures de Nitrosomonas et leur obtention Mikrobiologuia”. 1953, 22, 377.
- IMSHENECKI.—“Physiological properties of microorganism strains obtained with the aid of intensified factors”. Mikrobiologuia 1955, 24, 14.
- IEWIS y PRAMER.—“Isolation of Nitrosomonas in pure culture”. J. Bact. 1958, 76, 524.
- JENSEN.—“Nitrification of oxime compounds by heterotrophic bacteria”. J. Gen. Microbiol. 1951, 5, 360.
- JENSEN y GUNDERSEN.—“Biological Decomposition of aromatic Nitrocompounds”. Nature 1955, 175, 341.
- KINGMA BOLTJES.—“Recherches sur les bacteria nitrifiants”. These 1934.
- KAUFFMAN y BOQUEL.—“Nouvelle methode de determination du pouvoir nitrificateur d'une terre”. Ann. Inst. Pasteur 1951, 81, 667.
- LANDELON y VAN TICHELEN.—“Dinámica de la oxidación de los nitritos por el N. Winogradsky”. J. Bact. 1939, 79, 60.
- LEES.—“Isolation of the nitrifying organisms from soil”. Nature 1951, 167, 355.
- LEES y QUASTEL.—“Biochemistry of nitrification in soil II”. 1946, 40, 803-824.
- MEIKLEJOHN.—“Effects of glucose on impure cultures of nitrifying bacteria”. Plant. Soil. 1951, 3, 88.
- MEIKLEJOHN.—“Minimum Phosphate and Magnesium requirements of nitrifying Bacteria”. Nature 1952, 170, 1.131.
- MEIKLEJOHN.—“Iron and bacteria of nitrifying”. J. Gen. Micro. 1953, 8, 58.
- MEIKLEJOHN.—“The nitrifying bacteria a review”. J. Soil. Sc. 1953, 4, 59.
- POCHON y TCHAM.—“Recherches sur les phenomene biologiques d'amonification dans les sols”. Ann. Inst. Pasteur 1947, 73, 693.
- POCHON.—“Manuel Technique d'analyse Microbiologique du sol”. Masson et cie. Paris 1954.
- POCHON y TARDIEUX.—“Techniques D'Analyse en Microbiologie du sol”. Mandé (Seine) 1962.

- QUASTEL y SCHOLEFIEL.—“*Biochemistry of nitrification in soil*”. Bac. Rev. 1951, 15, I.
- VIRTANEN.—“*Biological nitrogen fixation*”. Nature 1945 a, 155, 747.
- WINOGRADSKY.—“*Microbe de la Nitrification. Travaux recentts*”. Ann. Inst. Pasteur 1930, 27, 681.
- WINOGRADSKY.—“*Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification*”. C.R.Ac.Sc. 1931, 192, 1,000.
- WINOGRADSKY.—“*Microbiologie du soil. Problemes et methodesq. Masson et cie*”. Paris 1949, 753.