



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

“EFECTO DEL PORCENTAJE DE RETENCIÓN DE AGUA EN LA  
DEGRADACIÓN DE UREA EN SUELOS CON DISTINTO  
CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
de los requisitos para optar al Título de:

**Químico Ambiental**

**MITZA MACARENA GONZÁLEZ ROJAS**

Directoras del Seminario de Título: Dra. Margarita Carú M.  
Dra. María Cecilia Rojas G.

Enero de 2018  
Santiago – Chile

**ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el la candidata:

**MITZA MACARENA GONZÁLEZ ROJAS**

“EFECTO DEL PORCENTAJE DE RETENCIÓN DE AGUA EN LA DEGRADACIÓN DE UREA EN SUELOS CON DISTINTO CONTENIDO DE CARBONO ORGÁNICO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

### COMISIÓN DE EVALUACIÓN

*Dra. Margarita Carú.*

**Directora Seminario de Título**

---

*Dra. Cecilia Rojas.*

**Directora Seminario de Título**

---

*Dr. Richard Toro.*

**Presidente**

---

*Dra. Cecilia Labbé.*

**Correctora**

---

Santiago de Chile, Enero 2018

## BIOGRAFÍA.



Hija de profesores, nací en un hospital actualmente demolido, en la ciudad de Antofagasta, donde pasé mis primeros años de vida.

Cursé toda mi educación obligatoria en la árida región de Atacama, en un camino lleno de contrastes en el que además, conocí el significado de la palabra desigualdad. Posteriormente decidí asentarme en la Región Metropolitana para seguir la carrera de Química Ambiental, convencida de crecer junto con un nuevo enfoque de la ciencia.

Me gusta apreciar la música, el silencio, lo urbano, lo onírico y lo absurdo, así como preparar y disfrutar de un buen café. Si es con un dulce, mejor.

## DEDICATORIA.

*...en memoria de aquellos que ya no están.  
Desde ahora y para siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A las doctoras Margarita Carú y María Cecilia Rojas por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, así como por su comprensión y enorme paciencia en todo este tiempo.

A la doctora Cecilia Labbé y María Inés Polanco por todos los momentos compartidos, la paciencia y la preocupación.

Al doctor Richard Toro por su disponibilidad y observaciones. Agradezco mucho la dedicación en las correcciones. Fue un proceso de mucho aprendizaje.

A Marisol Aravena por toda su ayuda y las siempre divertidas conversaciones en pregrado. Espero de todo corazón que tu dedicación y compromiso sean siempre recompensados. ¡No cambies nunca!

A Sebastián León, Soledad Ramírez y Catalina Torres. Aprender de y con ustedes ha sido una experiencia enriquecedora, interesante y muy entretenida.

A mis padres, a mis tías, a mi abuelita y a mi Tiito. Abrazos al cielo, encantador de la vida. Dale cariños de mi parte a la lobuna y a la chascona felpuda.

Finalmente, un agradecimiento especial a mis queridos, Ángelo, Javi, Cata, Cielo y Sasha. Los quiero mucho, gracias por todo su cariño, en las buenas, en las malas y las re-malas.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antecedentes generales.....	1
1.1.1. Agroquímicos y su efecto en el medio ambiente.....	1
1.1.2. El nitrógeno como nutriente.....	1
1.2. Antecedentes específicos.....	2
1.2.1. Ciclo del nitrógeno en el suelo.....	2
1.2.1.1. Fijación biológica de nitrógeno.....	2
1.2.1.2. Nitrificación.....	3
1.2.1.3. Desnitrificación.....	4
1.2.1.4. Asimilación (inmovilización).....	4
1.2.1.5. Amonificación (mineralización).....	4
1.2.2. Factores edáficos que inciden en el ciclo del nitrógeno.....	5
1.2.2.1. Actividad ureásica (mineralización).....	5
1.2.2.2. Actividad nitrificante.....	6
1.2.2.3. Actividad desnitrificante y DNRA.....	6
1.2.3. Ingresos y salidas de nitrógeno del suelo: contaminación ambiental.....	7
1.3. Hipótesis.....	8
1.4. Objetivos.....	8
1.4.1. Objetivo General.....	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	8
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
2.2. Origen de suelos.....	10
2.3. Diseño y montaje de microcosmos.....	10
2.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo.....	11
2.4.1. Contenido hídrico y capacidad de retención de agua del suelo.....	11
2.4.2. Densidad aparente y densidad real.....	11
2.4.3. Contenido de carbono orgánico.....	12
2.4.4. Contenido de amonio.....	12
2.4.5. Contenido de nitrato.....	12
2.4.6. pH y potencial de óxido-reducción.....	13
2.5. Análisis de datos.....	13
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
3.2. Diseño de montajes y microcosmos.....	14
3.3. Parámetros fisicoquímicos del suelo.....	14

3.4.	Validación del método de determinación de amonio .....	15
3.5.	Elección y validación del método de determinación de nitrato .....	16
3.6.	Parámetros enzimáticos aparentes para la actividad ureásica de los microorganismos del suelo .....	18
3.7.	Parámetros edáficos y actividad nitrificante: curvas de progreso de las reacciones de formación de $N-NH_4^+$ y de $N-NO_3^-$ a partir de urea.....	21
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
4.1.	Evaluación del efecto de la capacidad de retención de agua y el contenido de carbono orgánico en los parámetros cinéticos aparentes de la actividad ureásica.....	28
4.2.	Evaluación del efecto de la CRA, contenido de CO sobre la actividad ureásica y la actividad nitrificante .....	30
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Parámetros fisicoquímicos de los suelos Antumapu y Alhué .....	14
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de recuperación en muestras de amonio por el método de Kandeler y Gerber .....	16
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de recuperación en muestras de nitrato por el método de Forster .....	18
<b>Tabla 4.</b> Parámetros cinéticos aparentes para la degradación de urea en suelos Antumapu y Alhué .....	20
<b>Tabla 5.</b> Resultados del ANOVA de dos vías para el contenido de amonio del suelo en la curvas de saturación de ureasa .....	20
<b>Tabla 6.</b> Correlaciones de Pearson entre la concentración de urea y la velocidad inicial de suelo Antumapu y Alhué .....	21
<b>Tabla 7.</b> Resultados del ANOVA de dos vías para los parámetros edáficos del suelo en las curvas de progreso.....	25
<b>Tabla 8.</b> Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos de suelo Antumapu .....	26
<b>Tabla 9.</b> Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos de suelo Alhué .....	27



## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Principales reacciones del ciclo del nitrógeno en suelos .....	2
<b>Figura 2.</b> Reacción de fijación de nitrógeno atmosférico por el complejo nitrogenasa.....	2
<b>Figura 3.</b> Reacciones involucradas en la oxidación de amonio a nitrito. AMO: amonio monooxigenasa; HAO: hidroxilamina oxidorreductasa .....	3
<b>Figura 4.</b> Reacción de oxidación de nitrito a nitrato.....	4
<b>Figura 5.</b> Ejemplos del proceso de amonificación en suelos: desaminación oxidativa de glutamato e hidrólisis de urea .....	5
<b>Figura 6.</b> Reacción de nitración del ácido salicílico .....	13
<b>Figura 7.</b> Suelo Antumapu (izquierda), suelo Alhué (derecha) .....	14
<b>Figura 8.</b> Espectro de absorción del complejo del método para la determinación de amonio. Concentración de estándar: 0,6 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$ .....	15
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración para la determinación de amonio para el método de Kandeler & Gerber .....	16
<b>Figura 10.</b> Curvas de calibración para la cuantificación de nitrato para los métodos de Yang y Forster .....	17
<b>Figura 11.</b> Curvas de saturación de actividad ureásica en el suelo .....	19
<b>Figura 12.</b> Contenido hídrico (CH) y potencial óxido reducción (ORP) en función del tiempo.....	22
<b>Figura 13.</b> Curvas de progreso de pH, amonio y nitrato. ....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS.

<b>[S]<sub>0,5</sub></b>	Concentración de semisaturación
<b>AOB</b>	Bacterias oxidadoras de amonio
<b>CH</b>	Contenido hídrico
<b>CRA</b>	Capacidad de retención de agua
<b>CO</b>	Carbono orgánico
<b>DNRA</b>	Dissimilatory nitrate reduction to ammonium
<b>ES</b>	Complejo enzima-sustrato
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>NOB</b>	Bacterias oxidadoras de nitrito
<b>ORP</b>	Oxidation reduction potential
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidad máxima

## RESUMEN.

El contenido hídrico afecta la actividad ureásica y nitrificante en los suelos, por ende influye en los cambios de pH y potencial de óxido reducción. Dentro de las etapas del ciclo del nitrógeno en el suelo, la degradación de urea corresponde a la mineralización de nitrógeno orgánico mediante la actividad de la enzima ureasa de origen microbiano y sus principales productos de degradación son amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y posteriormente nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). En este trabajo se estudió el efecto de la capacidad de retención de agua (CRA) sobre las curvas de saturación de ureasa y las curvas de progreso de amonio y nitrato en condiciones de saturación por sustrato mediante ensayos con microcosmos con dos suelos de la Zona Central de Chile que difieren en su contenido de carbono orgánico (CO): suelo de la localidad Alhué (Región del Libertador General Bernardo O'Higgins) con bajo CO y suelo del Campus Antumapu (Región Metropolitana) con alto CO.

Se construyeron microcosmos al 60 y 100 % de la CRA de cada suelo y se incubaron con distintas concentraciones de urea hasta por 24 horas para determinar la concentración de saturación de la enzima. Para la curva de progreso se incubaron los microcosmos en condiciones de saturación por sustrato en las mismas condiciones anteriores por 16 días. Para el análisis estadístico se utilizó el coeficiente de Correlación de Pearson y Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con intervalos de confianza superiores al 95 %.

Los resultados de las curvas de saturación de ureasa mostraron que en ambos suelos al 100 % de la CRA disminuye la velocidad máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) y la concentración de semisaturación ( $[\text{S}]_{0,5}$ ). Esto se explica porque a una mayor CRA, la menor concentración de  $\text{O}_2$  limita los procesos metabólicos de los microorganismos capaces de degradar urea (aeróbicos). La actividad ureásica es mayor en el suelo Antumapu debido a que un mayor contenido de CO se asocia a una mayor capacidad para retener microorganismos capaces de degradar urea. De acuerdo al ANOVA de dos vías hay diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de saturación para ambos suelos. En el suelo Alhué el factor tratamiento (CRA) fue el causante de la mayor parte de la varianza total (43,73 %) junto con el factor concentración (43,01 %), mientras que en el caso del suelo Antumapu la mayor parte de la varianza total proviene del factor concentración (51,37 %), seguido del factor tratamiento (35, 41 %). En las curvas de progreso se evaluó el efecto de la CRA sobre los parámetros edáficos del suelo (potencial de óxido reducción, pH, contenido de amonio, contenido de nitrato). El ANOVA de dos vías muestra que el factor tiempo dio cuenta de la mayor parte de la varianza total en el

potencial de óxido reducción (67,14 y 96,45 % para Antumapu y Alhué respectivamente), pH (91,34 y 96,57 %), contenido de amonio (94,41 y 97,95 %) y contenido de nitrato (69,03 y 87,10 %). Respecto a las curvas de progreso del contenido de amonio, hubo diferencias estadísticamente significativas para Antumapu, a diferencia de los factores tratamiento e interacción en Alhué. En cuanto a la actividad nitrificante, esta fue baja comparada a la ureásica, probablemente a causa de los efectos inhibitorios de la concentración de amonio junto al alto pH del suelo. Además, los resultados del ANOVA de dos vías indican que los factores tratamiento (14,08 y 1,70%, para Antumapu y Alhué respectivamente) e interacción (15,80 y 10,34 %) tuvieron mayor aporte a la varianza total comparado a lo ocurrido con el contenido de amonio. Las bacterias oxidadoras de amonio y las bacterias oxidadoras de nitrito son estrictamente aeróbicas, por lo que es esperable que sean susceptibles a los tratamientos al 100 % de la CRA, debido a una menor concentración de O<sub>2</sub> disponible y su difusión más lenta.

En conclusión, el aumento de la actividad ureásica se relaciona principalmente con un mayor contenido de carbono orgánico del suelo y se favorece al 60 % de la CRA. En el caso de la actividad nitrificante, está fuertemente regulada por el efecto combinado del potencial de óxido reducción y pH, junto con el contenido de amonio. No hay claridad respecto al efecto del tratamiento en cada suelo.

## ABSTRACT.

The hydric content affects the urease and nitrifying activity in soils, therefore it influences changes in pH and oxidation-reduction potencial. In the steps of the nitrogen cycle in soils, urea degradation corresponds to the mineralization of organic nitrogen through the activity of the urease enzyme of microbial origin and its main degradation products, ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). In this work it was studied the effect of water holding capacity (WHC) on urease saturation curves and ammonium and nitrate content progress curves in substrate saturation conditions using microcosms with two soils from the Central Zone of Chile that differ in their organic carbon content (OC): Alhué soil (Libertador General Bernardo O'Higgins region) with low OC and Campus Antumapu soil (Metropolitana region) with high OC.

Microcosms were made with 60 and 100% WHC for each soil and they were incubated with different urea concentrations up to 24 hours to establish the enzyme saturation concentration. For the progress curve, microcosms were incubated in substrate saturation conditions at the same previous conditions for 16 hours. Statistical analysis included Pearson correlation coefficient and two way Analysis of Variance (ANOVA), with confidence interval higher than 95 %.

Urease saturation curve results show that both soils at 100% WHC decreasing their maximal velocity ( $V_{\text{máx}}$ ) and semi-saturation concentration ( $[\text{S}]_{0,5}$ ). This is explained because at a higher WHC, the lower concentration of  $\text{O}_2$  limits metabolic processes of microorganisms able to degrade urea (aerobic). The urease activity is higher in Antumapu soil, due to a higher OC that it is associated to a higher capacity to retain microorganisms capable to degrade urea. According to the two-way ANOVA there are statistically significant differences between saturation curves in both soils. In Alhue soil the treatment factor (WHC) was the cause of the major part of total variance (43.73%) together with the concentration factor (43.01%), while in Antumapu soil the major part of total variance comes from concentration factor (51.37%), followed by treatment factor (35.41%).

In progress curves was evaluated the effect of WHC on edaphic parameters of soils (oxidation-reduction potencial, pH, ammonium content, nitrate content). The two-way ANOVA shows that time factor gave account for the most of total variance on the oxidation-reduction potencial (67.14 and 96.45 % for Antumapu and Alhué respectively), pH (91.34 and 96.57 %), ammonium content (94.41 and 97.95 %) and nitrate content (69.03 and 87.10 %).

According to the ammonium content in progress curves, there are statistically significant differences for Antumapu soil, unlike the treatment and interaction factors in Alhué. The nitrifying activity was lower than ureasic, probably due to ammonium content inhibition effect and a high soil pH. In addition to, the two-way ANOVA shows that treatment factor (14,08 y 1,70%, Antumapu and Alhué respectively) and interaction (15,80 and 10,34 %) had major contribution to total variance than in ammonium content. The ammonium oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria (responsible of nitrifying activity) are obligated aerobios, so it's expected that shows a sensitive behavior at 100 % WHC treatments, due to lower O<sub>2</sub> concentration and slower diffusion.

In conclusion, an increase in urease activity it's related to a higher OC content principally and it's favored at 60 WHC treatments. The nitrifying activity is highly regulated by the combined effect of oxidation reduction potential-pH, together with the ammonium content. There isn't a clear answer to the WHC retention effect in treated soils.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Antecedentes generales.**

#### **1.1.1. Agroquímicos y su efecto en el medio ambiente.**

Una variable determinante en la productividad agrícola es la disponibilidad de nutrientes en el suelo, por lo tanto para un alto rendimiento productivo es necesario el uso de fertilizantes que aporten nutrientes al suelo en formas asimilables para las plantas. En los últimos años la creciente demanda de alimentos por parte de la población ha llevado a que los agricultores incrementen la fertilidad y productividad del suelo mediante la adición de agroquímicos como fertilizantes y pesticidas (Havlin, 2005). Durante el siglo XX el uso de fertilizantes químicos produjo un incremento del 50% de la producción de cultivos a nivel mundial (Fageria & Baligar, 2005). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agroquímicos tiene también consecuencias negativas, ya que se produce un aumento de compuestos nitrogenados en el suelo que afectan el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos, especialmente del ciclo del nitrógeno en el suelo, atmósfera y aguas, desde escalas locales a globales (Galloway y col, 2004).

#### **1.1.2. El nitrógeno como nutriente.**

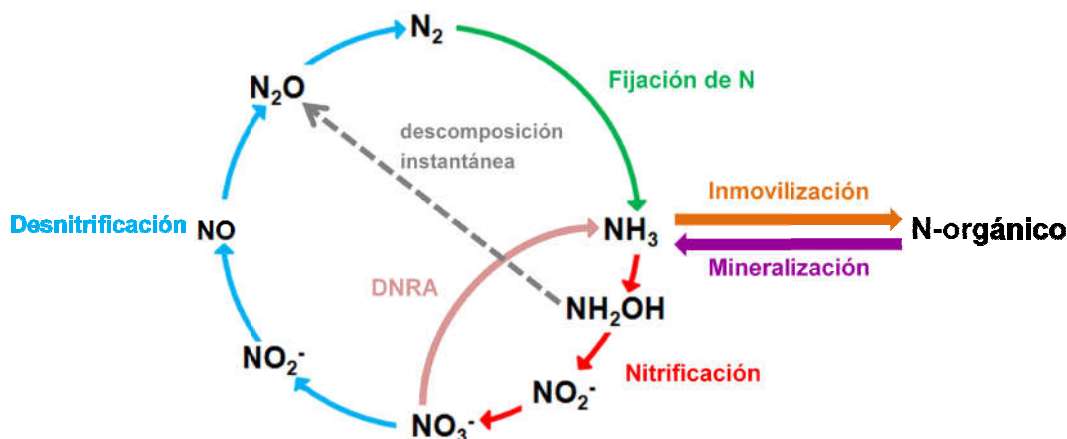
En el caso del nitrógeno, éste es un componente esencial de los aminoácidos, los ácidos nucleicos, los aminoazúcares y de sus polímeros siendo uno de los principales nutrientes críticos para la supervivencia de todos los organismos vivos. La atmósfera es el principal reservorio de este elemento, donde constituye el 79% de los gases. Sin embargo, por su incorporación lenta y difícil a la biosfera, la disponibilidad de nitrógeno es un factor limitante para la producción primaria en muchos ecosistemas (Atlas & Bartha, 2001). Por lo tanto, el ciclo del nitrógeno tiene una importancia fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas debido a que tanto la limitación como el exceso de nitrógeno, en sistemas naturales o en sistemas manejados por el hombre, altera significativamente su productividad y sustentabilidad.

Existen varios tipos de fertilizantes según el nutriente a aportar, siendo los principales nitrógeno (amoníaco anhidro, urea, nitrato de amonio), fósforo (superfosfato, triple superfosfato) y potasio (cloruro de potasio, sulfato de potasio, nitrato de potasio) (Scherer, 2005).

## 1.2. Antecedentes específicos.

### 1.2.1. Ciclo del nitrógeno en el suelo.

Las principales reacciones de conversión del nitrógeno en el suelo son llevadas a cabo exclusivamente por microorganismos en distintas reacciones de óxido reducción como se observa en la figura 1.

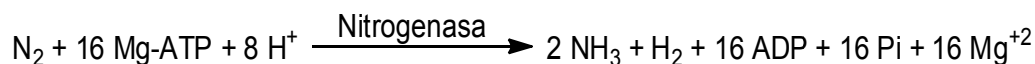


**Figura 1.** Principales reacciones del ciclo del nitrógeno en suelos.

La entrada de nitrógeno al suelo puede ser por fijación biológica, deposición atmosférica o de forma antrópica mediante el uso de fertilizantes (Bottomley & Myrold, 2015; Galloway y col. 2004).

#### 1.2.1.1. Fijación biológica de nitrógeno.

La fijación del nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio y es el ingreso natural de nitrógeno a los ecosistemas en la forma disponible para la biota. La fijación biológica del nitrógeno la realiza exclusivamente grupos de microorganismos pertenecientes al dominio bacterias y arqueas. Estos microorganismos poseen en común la nitrogenasa, un complejo enzimático que lleva a cabo la reducción del N<sub>2</sub> y está compuesto por dos metalo-proteínas que catalizan la reducción de N<sub>2</sub>, dependiente de ATP, para la producción de dos moléculas de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. En la figura 2 se observa la reacción involucrada en este proceso:



**Figura 2.** Reacción de fijación de nitrógeno atmosférico por el complejo nitrogenasa.

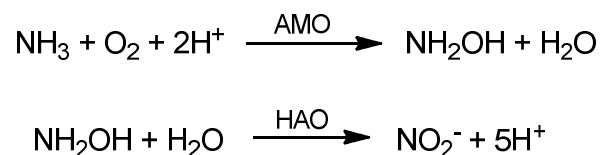


Si bien son pocas las especies bacterianas fijadoras de N<sub>2</sub>, ocupan una amplia variedad de fuentes de energía como luz (fotótrofos), elementos y compuestos inorgánicos (litótrofos), junto con una gran variedad de compuestos orgánicos (heterótrofos), representados por aerobios obligados además de facultativos y anaerobios estrictos. En estas bacterias, la fijación de nitrógeno está regulada de tal manera que ellas no fijan nitrógeno molecular si hay formas combinadas de nitrógeno disponible para sus requerimientos nutricionales, ya que poseen un eficiente mecanismo de asimilación de NH<sub>3</sub>, evitando la acumulación y toxicidad de los compuestos inorgánicos del nitrógeno (Bottomley & Myrold, 2015).

Por otra parte, otro ingreso de nitrógeno al ecosistema ocurre por fijación química de nitrógeno mediante el proceso Haber-Bosch, utilizado para la producción de fertilizantes nitrogenados (Galloway y col. 2003). Una fracción entre un 25 y 50 % de los fertilizantes aplicados al suelo se incorporan en una amplia variedad de cultivos, el resto del fertilizante no utilizado se acumula e ingresa al ciclo biogeoquímico (Chien y col. 2009). El reciente interés por los problemas ambientales ha puesto especial atención sobre este ingreso antropogénico de nitrógeno combinado al ecosistema ya que ha generado un aumento de la producción y movilidad del Nitrógeno reactivo, produciendo una sobrecarga al ciclo que ha contribuido a la acidificación, fertilización y eutrofización de diferentes ecosistemas (Vitousek y col. 1997; Galloway y col. 2003).

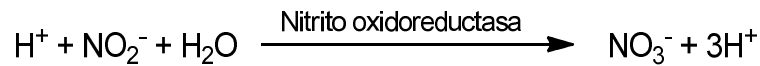
#### 1.2.1.2. Nitrificación.

Es la etapa del ciclo en la que se produce la oxidación autotrófica de amonio a nitrato, mediante nitrito como intermediario en reacciones sucesivas de oxidación (figura 3). La etapa de oxidación de amonio a nitrito es realizada por las bacterias oxidadoras de amonio (AOB), también denominadas nitrificadores primarios.



**Figura 3.** Reacciones involucradas en la oxidación de amonio a nitrito. AMO: amonio monooxigenasa; HAO: hidroxilamina oxidorreductasa.

La oxidación de nitrito a nitrato es realizada por las bacterias oxidadoras de nitrito (NOB) u oxidadores secundarios mediante la reacción indicada en la figura 4.



**Figura 4.** Reacción de oxidación de nitrito a nitrato.

#### **1.2.1.3. Desnitrificación.**

También denominada respiración del nitrato, consiste en la reducción en varias etapas del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) vía nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) como intermediarios. Este proceso es principalmente anaeróbico donde el nitrato actúa como el aceptor final de electrones en el proceso de respiración. La desnitrificación o respiración del nitrato ocurre principalmente en suelos cuando el 60% o más de los espacios porosos contienen agua (Robertson & Groffman, 2015).

Una segunda vía de desnitrificación consiste en la reducción disimilatoria de nitrato a amonio (DNRA por su sigla en inglés) o amonificación del nitrato. La principal diferencia entre estos procesos que compiten es que en la desnitrificación se pierde nitrógeno del sistema en forma gaseosa ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{N}_2$ ), en contraste con la reducción disimilatoria de nitrato a amonio que se encarga de mantener el nitrógeno en el suelo, procesos que se dan especialmente en suelos inundados (Rütting y col. 2011; Domínguez y col. 2007; Yin y col. 2002).

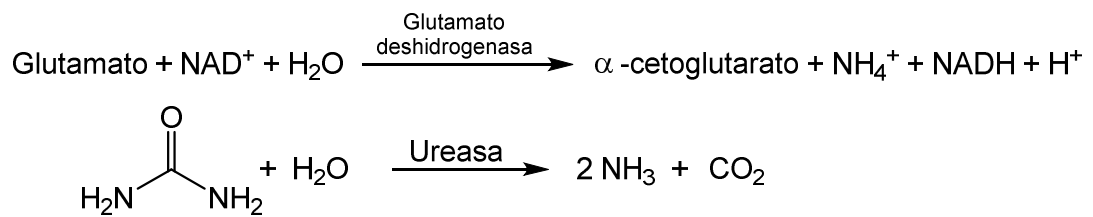
#### **1.2.1.4. Asimilación (inmovilización).**

Es el proceso en el que formas inorgánicas de nitrógeno como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NO}_2^-$  se incorporan a la biomasa del suelo, es decir, se utilizan para sintetizar compuestos de interés para los microorganismos como proteínas, nucleótidos, N-azúcares, etc. aunque también puede referirse a  $\text{NH}_4^+$  retenido en ciertas arcillas o materia orgánica (Coyne & Frye, 2005).

#### **1.2.1.5. Amonificación (mineralización).**

Es la etapa que lleva a cabo la hidrólisis del nitrógeno orgánico con la consecuente liberación de amoníaco, el que se protona por acción de la solución suelo para formar amonio. Ejemplos de este proceso son la desaminación oxidativa

y la degradación de urea (figura 5), lo que indica que este proceso puede ocurrir tanto con sustratos presentes en el suelo como externos.



**Figura 5.** Ejemplos del proceso de amonificación en suelos: desaminación oxidativa de glutamato e hidrólisis de urea.

## 1.2.2. Factores edáficos que inciden en el ciclo del nitrógeno.

### 1.2.2.1. Actividad ureásica (mineralización).

Distintos reportes indican que son muchos los factores edáficos que inciden en la actividad ureásica en suelos, donde se han citado como principales a la temperatura (O'Toole & Morgan, 1984), pH (Kandeler & Gerber, 1988), contenido de carbono orgánico (Tabatabai & Bremner, 1972; Borie & Fuentealba, 1982), contenido de arcillas (Tabatabai, 1973), la capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Casanova & Benavides, 1995) y humedad (Dalal, 1974; Sahrawat, 1984; Antil y col. 1993). En el caso de la humedad no hay un consenso respecto a su efecto ya que se han encontrado resultados contradictorios. Además, no hay muchos estudios acerca del efecto de la humedad en la degradación de urea y la dinámica del ciclo del nitrógeno en el suelo ya que los estudios de este tipo se han enfocado en las curvas de progreso de amonio, nitrato y pH variando temperatura, dosis de sustrato, efecto del pastoreo, metales pesados o uso de inhibidores (Campillo & Rodríguez, 1984; Bremner & Chai, 1989; Doelman & Haanstra, 1986, Cartes y col, 2009; McGarry y col, 1987; Zhengping y col, 1994; O'Toole & Morgan, 1984).

La actividad ureásica correlaciona fuertemente con el contenido de carbono orgánico (Casanova & Benavides, 1995; Beri y col, 1978; Tabatabai & Bremner, 1972) y con la capacidad de intercambio catiónico (Casanova & Benavides, 1995; Dalal, 1975). Los suelos con mayor contenido de carbono orgánico poseen una mayor retención de agua y por lo tanto una mayor capacidad para mantener una densidad más alta de microorganismos, entre los cuales están los que son capaces de degradar urea (Borie & Fuentealba, 1982). Sin embargo, en lo informado por Cartes y col, (2009), quienes compararon dos andisoles levemente ácidos de la

zona sur de Chile (suelos derivados de ceniza volcánica), encontraron que el que posee menor contenido de carbono orgánico es el que presenta mayor actividad ureásica. En este caso la mayor diferencia entre los suelos se encuentra en la capacidad de intercambio catiónico y el que posee mayor CIC es el que posee mayor actividad. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Casanova & Benavides (1995) en suelos de la zona central de Chile, también se asocia una mayor actividad ureásica a una mayor capacidad de intercambio catiónico en suelos con valores similares de pH y carbono orgánico. Estos antecedentes son de interés puesto que fueron realizados en suelos chilenos de distintos orígenes y características, siendo el suelo Alhué (zona central de Chile) utilizado en este trabajo. Los resultados sugieren que la capacidad de intercambio catiónico es un parámetro que se debe considerar en los estudios de actividad ureásica y que su influencia dependería del tipo de carga del suelo (variable o permanente).

#### **1.2.2.2. Actividad nitrificante.**

Las bacterias que realizan las reacciones de nitrificación (AOB, NOB) se caracterizan por tener un metabolismo estrictamente aeróbico (Roberston & Groffman, 2015), es decir, su actividad se inhibe en condiciones limitantes o carentes de oxígeno, lo que en suelos ocurre aproximadamente a valores de ORP menores a +300 mV (DeLaune & Reddy, 2005), por lo que está relacionada con el contenido hídrico del sistema. El pH óptimo de nitrificación se encuentra en un rango cercano a la neutralidad (Nicol y col, 2008), mientras que en muchos casos se inhibe a valores menores que 4,5 (He y col, 2012) y también a mayores que 7,8 (Van Cleemput & Samater, 1996). Este último caso es de interés agrícola ya que en suelos fertilizados con altas concentraciones de urea, la actividad ureásica produce una alcalinización del suelo, junto con un alto contenido de amonio, lo que afecta negativamente la actividad de *Nitrobacter* (inhibe la acción de la nitrito oxidoreductasa), produciendo una acumulación de nitrito, compuesto que normalmente se degrada apenas se produce y que es tóxico para los cultivos (Coyne & Frye, 2005).

#### **1.2.2.3. Actividad desnitrificante y DNRA.**

El ciclo del nitrógeno en el suelo posee dos vías disimilatorias de reducción de nitrato: la desnitrificación y la DNRA (Tiedje, 1988). Mientras para la

desnitrificación había consenso de su ocurrencia en suelos, en general la DNRA no era considerada a pesar de la existencia de evidencias que demostraban que bacterias y hongos del suelo eran capaces de realizarla (Rütting, 2011).

La desnitrificación y la DNRA ocurren en condiciones similares y los principales factores que las regulan son el ORP y la relación  $C/NO_3^-$  (Tiedje, 1988). Fazzolari y col (1998), Tiedje y col (1982) encontraron que el factor clave para la partición entre desnitrificación y DNRA es la relación  $C/NO_3^-$  por sobre el ORP, donde la DNRA se favorece a altos valores de la relación  $C/NO_3^-$  en condiciones limitantes de nitrato. Tiedje (1988) indica que la importancia del CO, más que el contenido, es el tipo, ya que es la fuente de carbono la que regula las poblaciones de bacterias capaces de realizar los procesos de reducción. El efecto del pH no es del todo claro debido a que se han encontrado resultados contradictorios. Respecto a otras variables como la humedad o el contenido de nitrógeno del suelo, se ha encontrado correlaciones positivas, sin embargo no hay mayor información para hacer un análisis completo (Rütting y col, 2011).

### **1.2.3. Ingresos y salidas de nitrógeno del suelo: contaminación ambiental.**

El nitrógeno puede salir del suelo de varias maneras, ya sea como gas ( $N_2$ ,  $N_2O$ ,  $NO$  o  $NH_3$ ) o lixiviando como  $NO_3^-$ . En el caso de fertilizantes nitrogenados, las distintas formas de nitrógeno pueden generar diversos impactos ambientales en determinadas condiciones. De las especies gaseosas, la que más importancia posee en la actualidad es el óxido nitroso ( $N_2O$ ), un contaminante atmosférico moderno cuyo Índice-GWP es aproximadamente 300 veces mayor respecto al dióxido de carbono en un período de 100 años (IPCC, 1992), donde el 65 % de las sus emisiones provienen del suelo (Smith, 2005).

La liberación de  $N_2O$  es consecuencia de la actividad desnitrificante que se favorece cuando hay condiciones anaeróbicas, por ejemplo en los cultivos de arroz (Domínguez y col. 2007), los que a nivel mundial se concentran en un 90 % en Asia (Witt & Haefele, 2005), ya que estos suelos son sometidos a inundaciones propiciando las condiciones de anoxia. Otro contaminante gaseoso es el amoníaco, cuya liberación a la atmósfera a partir del uso de urea se ve favorecida en suelos de pH superior a 8,0 y también al aplicarla directamente a la superficie del suelo, llegando a pérdidas por volatilización de hasta un 40 % (Casanova & Benavides 2009).

El uso de fertilizantes amoniacales como la urea tiene también como problema la acidificación del suelo como consecuencia de la actividad nitrificante (Bernier, 2006) y un aumento en la solubilidad de metales como aluminio y manganeso, los que afectan de forma negativa el crecimiento vegetal por su toxicidad (Campillo & Rodríguez, 1984). El nitrato, producto de la nitrificación, debido a su alta solubilidad en agua y carga negativa que se repele con la de los coloides del suelo, puede lixiviar con gran facilidad en particular en suelos expuestos a las lluvias, produciendo eutrofización (Powlson & Addiscott, 2005) o contaminación de los acuíferos.

Considerando que la urea es el fertilizante nitrogenado más utilizado a nivel mundial (World Fertilizer Consumption Statistics, 2015) y que su degradación microbiana en el suelo está determinada por la actividad de la enzima ureasa para producir amonio, cuya degradación a su vez depende de los grupos microbianos AOB y NOB, es de interés evaluar los factores que influyen en la degradación de urea en el suelo.

### **1.3. Hipótesis.**

“La capacidad de retención de agua del suelo y el contenido de carbono orgánico afectan la degradación de urea en suelos, modificando la actividad ureásica y nitrificante de los microorganismos”.

### **1.4. Objetivos.**

#### **1.4.1. Objetivo General.**

Evaluar el efecto del porcentaje de retención de agua en la actividad ureásica y nitrificante de dos suelos que difieren en su contenido de carbono orgánico.

#### **1.4.2. Objetivos específicos.**

1. Diseñar el ensayo de microcosmos y determinar parámetros fisicoquímicos de los suelos.
2. Determinar parámetros cinéticos aparentes (constante de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) de la ureasa para los suelos tratados con urea a distintos porcentajes de retención de agua.

3. Determinar el contenido de amonio y nitrato en función del tiempo en los suelos tratados con urea a distintos porcentajes de la capacidad de retención de agua para estimar la actividad ureásica y nitrificante.
4. Determinar el efecto de pH, potencial de óxido reducción, contenido de carbono orgánico, amonio y nitrato en la actividad ureásica y nitrificante.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.2. Origen de suelos.

Los suelos utilizados en este estudio para el montaje de los microcosmos provienen de dos localidades: a) Suelo de la localidad Alhué (33° 58' S, 71°16' W), Rancagua, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, Chile y b) Suelo de uso agrícola, Campus Antumapu (33° 34' S, 70° 38' W), Universidad de Chile, Región Metropolitana, Chile. Las muestras de suelo se obtuvieron de los primeros 10 centímetros superficiales. Las muestras fueron homogenizadas, posteriormente tamizadas a 2 mm, secadas al aire y guardadas a 4 °C hasta su uso.

### 2.3. Diseño y montaje de microcosmos.

A partir de los suelos recolectados se diseñaron dos tipos de microcosmos: microcosmos con suelo Alhué y Antumapu. Para la determinación de parámetros cinéticos aparentes ( $[S]_{0,5}$  y  $V_{máx}$ ) los microcosmos se construyeron en un matraz erlenmeyer de 50 mL, con 3 g de suelo, a los cuales se agregaron concentraciones de 1 a 140  $\mu\text{moles urea-N g}_s^{-1}$ , al 100 y 60 % de la capacidad de retención de agua del suelo (denominados como t100 y t60 respectivamente) en un sistema sellado con parafilm. El tiempo de incubación utilizado fue de 2 a 24 horas, a temperatura ambiente (en un rango de 20 a 25 °C) y en estático, de modo que la concentración de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  generada fuese menor al 10 % de la concentración inicial de sustrato para obtener la velocidad inicial de reacción. Todas las determinaciones se realizaron en triplicado.

Para las curvas de progreso: los microcosmos se construyeron en un frasco Schott de 250 mL que contenía 66 g de suelo con una concentración de 1680  $\mu\text{g urea-N g}_s^{-1}$  al 100 y 60 % de la capacidad de retención de agua del suelo (denominados t100 y t60 respectivamente) en un sistema cerrado con tapa, por un tiempo de incubación de 16 días, a temperatura ambiente (en un rango de 20 a 25 °C) y en estático. Paralelamente se incluyeron como controles microcosmos sin urea (sin sustrato) a los dos porcentajes de retención de agua (st100 y st60) y dos controles con suelo autoclavado para eliminar la actividad biológica del suelo.

A partir de estos microcosmos se realizaron las determinaciones de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , pH, potencial redox (ORP) y contenido hídrico (CH) durante 9 días y luego a los días 12 y 16. Diariamente los frascos se destaparon por un minuto para que el suelo se oxigenara. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



## **2.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo.**

### **2.4.1. Contenido de hídrico y capacidad de retención de agua del suelo.**

El CH de cada suelo se determina por gravimetría (Sadzawka y col. 2006). Para ello, se masa 1 g de suelo para determinar el peso húmedo (SH) y luego se lleva a estufa a 105 °C por 12 horas, obteniéndose el suelo seco (SS). El CH se calculó según la siguiente fórmula.

$$CH = \left( \frac{SH - SS}{SS} \right) 100$$

La CRA del suelo se determinó calculando el volumen máximo de agua que es capaz de retener 5 g de suelo. En un embudo de decantación con un papel filtro, se agregaron 5 g de suelo y luego se agregó con cuidado 50 mL de agua destilada, se tapó el sistema y se dejó reposando por dos días. Se masa una parte del suelo húmedo (MH) y luego se lleva a estufa a 105 °C por 24 horas para determinar la masa seca (MS).

$$\% \text{ Capacidad de retención de agua} = \left( \frac{MH - MS}{MS} \right) 100$$

### **2.4.2. Densidad aparente y densidad real.**

El grado de compactación de los suelos se estimó mediante la determinación de la densidad aparente (DS) para ello se determinó la masa de un volumen determinado de suelo seco y se calculó como:

$$DS = \left( \frac{SS}{V} \right)$$

Para determinar la densidad real, el volumen de una masa determinada de suelo seco se determinó por desplazamiento de volumen, según lo descrito por Sadzawka y col. (2006).

### 2.4.3. Contenido de carbono orgánico.

El carbono orgánico (CO) se calculó gravimétricamente (Sadzawka y col. 2006) a partir de las muestras de suelo seco (SS) usadas para la obtención del CH. Las muestras se calcinaron en mufla a 400 °C por 16 horas y se obtuvo la masa de suelo calcinado (SC). El porcentaje de CO se calculó según la fórmula:

$$\% CO = \left( \frac{SS - SC}{SS} \right) 100$$

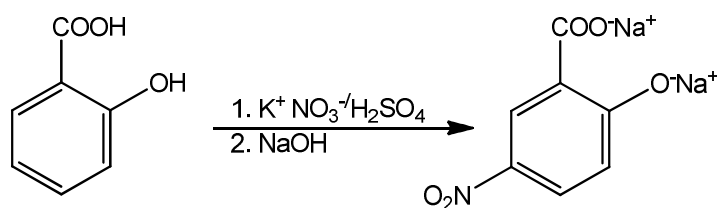
### 2.4.4. Contenido de amonio.

La extracción y determinación de  $\text{NH}_4^+$ -N se realizó según el protocolo descrito por Kandeler & Gerber (1988). Para ello se tomó 1 g de suelo proveniente de cada microcosmos y se extrajo el amonio con 10 mL de KCl 1 M (ácido pH 1 para la determinación de parámetros cinéticos aparentes) y agitó a 150 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminada la agitación, se dejó decantar la suspensión durante unos minutos y se filtró al vacío con papel Whatman No. 42. En caso de no medir instantáneamente, los extractos se guardaron refrigerados a 4 °C hasta 24 horas. El método se calibró con soluciones estándar de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y para la determinación de  $\text{NH}_4^+$ -N, a 0,5 mL de extracto de suelo se agregaron 2,5 mL de una solución de salicilato de sodio (8,5 %) y nitroprusiato de sodio en NaOH 0,15 M. Después de homogenizar se agregó 1 mL de dicloroisocianurato de sodio al 0,1 % (esta solución se preparó al momento de usar) y se dejó reposar durante 30 minutos para formar el complejo. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 677 nm. Los valores de absorbancia fueron estables por lo menos 8 horas a temperatura ambiente. La formación del complejo comienza con la reacción del amonio con el cloro en medio básico para formar cloramina, la que posteriormente reacciona con el ácido salicílico para formar el complejo.

### 2.4.5. Contenido de nitrato.

La extracción y determinación de  $\text{NO}_3^-$ -N se realizó según una modificación del protocolo descrito por Forster (1995). Se tomó 1 g de suelo proveniente de cada microcosmos y se extrajo el nitrato con 10 mL de KCl 1 M y se agitó durante 30 minutos a 150 rpm a temperatura ambiente. Una vez terminada la agitación, se dejó decantar durante unos minutos y se filtró al vacío con papel Whatman No. 42. En

caso de no medir instantáneamente, los extractos se guardaron refrigerados a -18 °C hasta 24 horas. El método se calibró con soluciones estándar de  $\text{KNO}_3$ . Para la determinación de  $\text{NO}_3^-$ -N, a 0,25 mL de extracto de suelo se agregaron 0,5 mL de una solución de ácido salicílico al 5 % en ácido sulfúrico concentrado (al 98 %, preparación cada dos días), la mezcla se agitó inmediatamente después de la adición de la solución ácida y se dejó reposar hasta enfriar. Con cuidado se agregaron 10 mL de NaOH 4 M, formándose un complejo amarillo, que fue cuantificado mediante la absorbancia a 410 nm. La absorbancia es estable al menos por dos días si las muestras se mantienen tapadas.



**Figura 6.** Reacción de nitración del ácido salicílico.

#### 2.4.6. pH y potencial de óxido-reducción.

El pH y ORP se determinaron potenciométricamente a partir de los extractos con KCl 1M. La determinación del pH en suelos sin tratamientos se realiza según el protocolo descrito por Sadzawka y col. (2006).

#### 2.5. Análisis de datos.

Se realizaron ANOVAs de dos vías para establecer si hubo diferencias significativas (hipótesis alternativa) en los parámetros edáficos (variables), con un intervalo de confianza (IC) del 95,00 al 99,99% ( $p < 0,05$  a  $p < 0,0001$ ), considerando como fuente de variación: concentración de urea, tratamiento (t60 respecto a t100) e interacción (curvas de saturación de ureasa) y tiempo, tratamiento e interacción (curvas de progreso). Se usó el coeficiente de correlación de Pearson para establecer la correlación entre la actividad ureásica y nitrificante con el contenido hídrico.

Los análisis fueron llevados a cabo con el programa GraphPad Prism versión 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

### 3. RESULTADOS.

#### 3.2. Diseño de montajes y microcosmos.

Los suelos obtenidos una vez tamizados a 2 mm presentan diferencias físicas apreciables (figura 7). Una de ellas es la tonalidad oscura del suelo Antumapu contrastado con los tonos más claros de Alhué. Además, en el suelo Antumapu se observa la presencia de agregados, lo que no ocurre en el suelo Alhué.



Figura 7. Suelo Antumapu (izquierda), suelo Alhué (derecha).

#### 3.3. Parámetros fisicoquímicos del suelo.

En la Tabla 1 se muestran los valores promedio de los parámetros fisicoquímicos de cada suelo. El suelo Antumapu es más alcalino que Alhué y además se caracteriza por tener una mayor porosidad, junto con un alto contenido de carbono orgánico. El suelo Antumapu también posee una mayor capacidad de retención de agua respecto al suelo Alhué. Esta propiedad del suelo depende del volumen de los poros o espacios poroso y del contenido de materia orgánica.

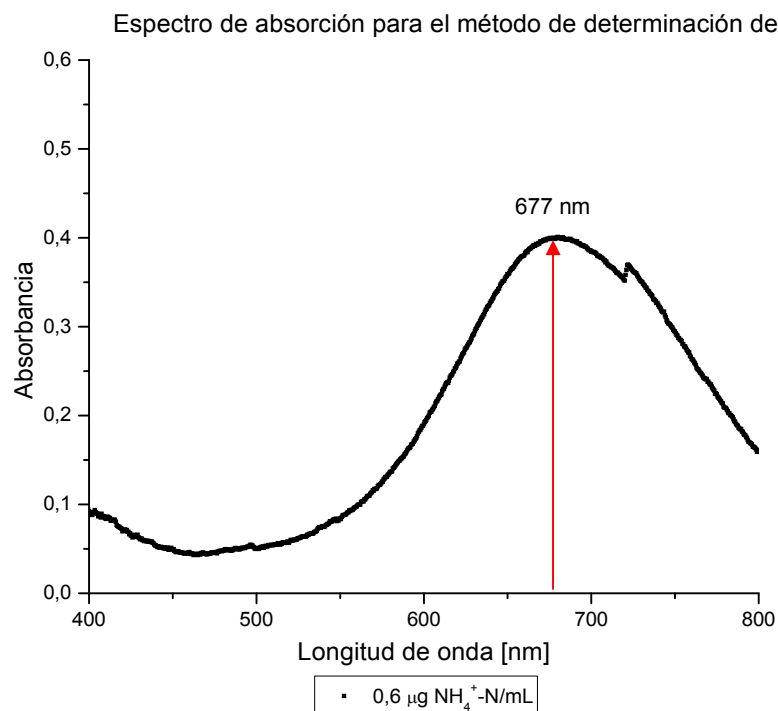
Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los suelos Antumapu y Alhué.

Suelo	densidad aparente <sup>a</sup>	densidad real <sup>a</sup>	% espacio poroso	% de agua a capacidad de campo	pH <sup>b</sup>	% Carbono orgánico
Antumapu	0,88 ± 0,02	2,20 ± 0,2	61,36 ± 25	58,8 ± 1,1	7,5 ± 0,1	23,8 ± 0,6
Alhué	1,01 ± 0,02	1,93 ± 0,1	48,18 ± 14	45,7 ± 0,8	6,6 ± 0,1	2,6 ± 0,3

<sup>a</sup>densidad en g/mL; <sup>b</sup>pH en KCl 1 M suelo:solución 1:2,5.

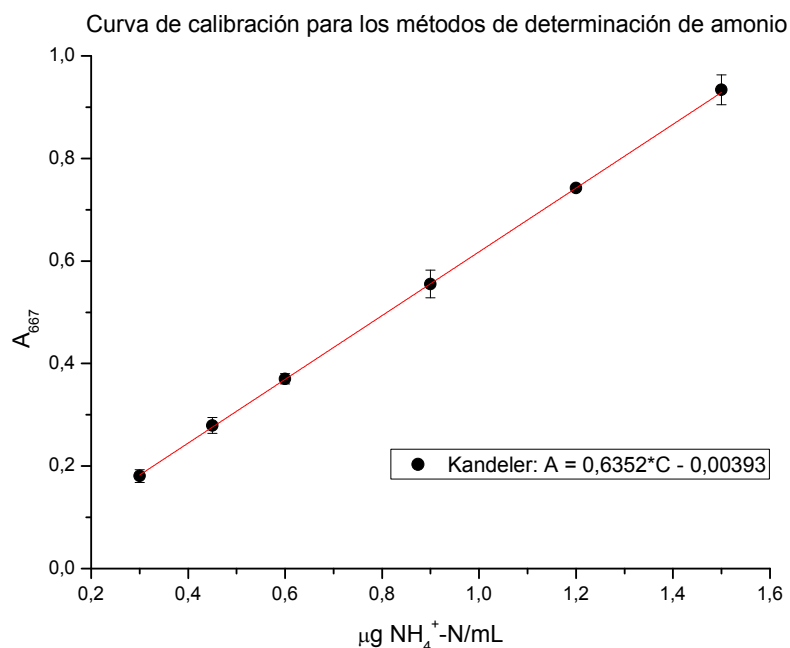
### 3.4. Validación del método de determinación de amonio.

Para la curva de calibración del método descrito por Kandeler & Gerber (1988), se encontró un rango lineal entre 0,3 a 1,5  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$ , un rango más acotado comparado al informado (0,5 a 2,0  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$ ). En la figura 8 se muestra el espectro de absorción del complejo, con una concentración de estándar de 0,6  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$ . Su absorbancia máxima fue de 677 nm, valor inferior a los 690 nm descritos en la bibliografía.



**Figura 8.** Espectro de absorción del complejo del método para la determinación de amonio. Concentración de estándar: 0,6  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$ .

El límite de detección del método es de 0,1  $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N/mL}$  y su sensibilidad es de 0,63562 mL/ $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N}$ , con un  $R^2$  de 0,9989 (figura 9), mientras que los porcentajes de recuperación para muestras con concentración conocida en solución y muestras de suelo se muestran en la tabla 2.



**Figura 9.** Curva de calibración para la determinación de amonio para el método de Kandeler & Gerber. Estándares disueltos en agua destilada. Valores promedio (triplicado) ± EE.

**Tabla 2.** Porcentajes de recuperación en muestras de amonio por el método de Kandeler y Gerber.

Muestra	Blanco sin suelo <sup>a</sup>		Antumapu <sup>b</sup>		Alhué <sup>b</sup>	
[NH <sub>4</sub> Cl]	100	300	100	300	100	300
% Rec	95,37 ± 1,01	98,83 ± 0,93	89,57 ± 1,32	92,12 ± 1,12	94,57 ± 1,71	98,12 ± 1,51

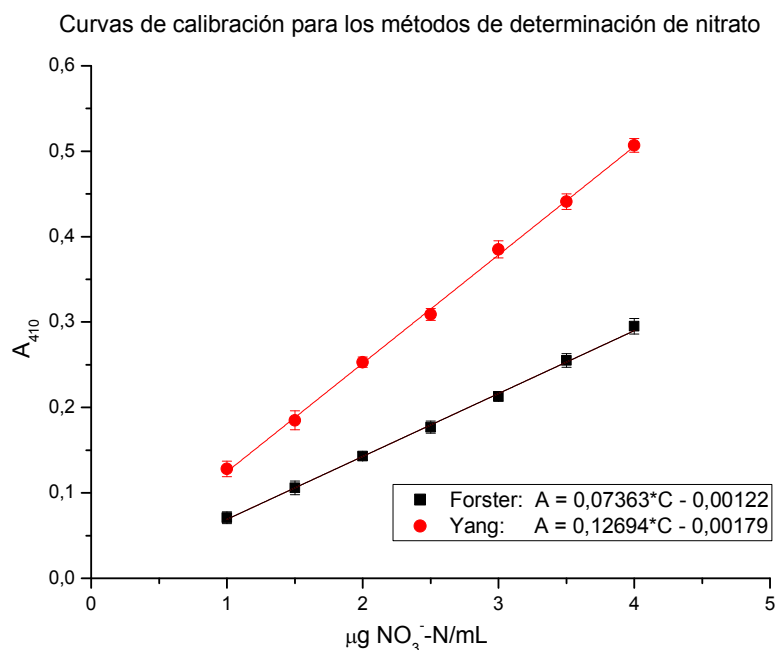
<sup>a</sup>[μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/mL]; <sup>b</sup>[μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/g<sub>suelo</sub>].

### 3.5. Elección y validación del método de determinación de nitrato.

Para la determinación de nitrato en muestras de suelo se probaron tres extractantes: agua desionizada, KCl 1M y 2M. Con agua desionizada los extractos no decantaron completamente, además de presentar turbiedad. Esto dificultó la filtración al vacío, sobretodo en el suelo Antumapu haciendo poco viable su uso. Las extracciones con KCl 1M y 2M fueron de un manejo rápido, sin turbiedad en los extractos, por lo que se procedió a realizar la curva de calibración con KNO<sub>3</sub> para los métodos de Yang y col. (1998) y Forster (1995) con estándares de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N en KCl 1M y 2M respectivamente. Ambos métodos tienen como principio la nitración del ácido salicílico en medio fuertemente ácido, donde en el método de Yang se elimina el extractante (a 105 °C en horno) en presencia de salicilato de sodio para

posteriormente adicionar ácido sulfúrico concentrado. En cambio en el método de Forster al extracto se adiciona una solución de ácido salicílico en ácido sulfúrico concentrado. En ambos métodos, después de 10 minutos de reposo se agrega NaOH 4M para permitir la formación del cromóforo, ya que al alcalinizar el medio se desprotona el complejo de ácido 5-nitrosalicílico. La absorbancia se mide a 410 nm.

Usando el método de Forster con KCl 2M no fue posible realizar la curva de calibración por lo que se escogió KCl 1M como extractante de  $\text{NO}_3^-$ -N. Si bien el ión  $\text{Cl}^-$  es un interferente en el método, porque reacciona con el nitrato para formar cloruro de nitrosilo, la recuperación de nitrato es mayor al 95 % con KCl 1M, no así en concentraciones superiores de KCl (Robarge y col. 1983). Además, el extractante no fue acidificado para detener la reacción de oxidación de amonio ya que las metodologías de nitración del ácido salicílico son sensibles a valores de pH ácidos (Yang y col. 1998). En la figura 10 se muestran las curvas de calibración para ambos métodos (en KCl 1M como medio).



**Figura 10.** Curvas de calibración para la cuantificación de nitrato para los métodos de Yang y Forster. Estándares disueltos en KCl 1M. Valores corresponden al promedio de tres réplicas  $\pm$  EE.

Se observa que el método de Yang es más sensible que el de Forster. Para las concentraciones iniciales de suelo y también para la adición de concentraciones conocidas de  $\text{KNO}_3$  a muestras de suelo, ambos métodos entregaron resultados similares. Sin embargo, en las curvas de progreso de formación de nitrato desde el

tiempo cero los valores determinados por el método de Yang fueron considerablemente inferiores a los de Forster (para ambos suelos y tratamientos), por lo que se realizaron pruebas utilizando KCl 1M-urea como extractante para descartar que el sustrato (urea) fuera un interferente. Los valores de absorbancia obtenidos no tuvieron diferencias con el extractante original, por lo que se descartó que hubiese sido debido a algún efecto del sustrato, sino a un problema propio del método de Yang, por lo que se decidió utilizar el método de Forster para la determinación  $\text{NO}_3^-$ -N.

El límite de detección del método de Forster es de  $0,5 \mu\text{g NO}_3^-$ -N/mL y el rango lineal es de 1 a  $4 \mu\text{g NO}_3^-$ -N/mL, con una sensibilidad de  $0,07317 \text{ mL}/\mu\text{g NO}_3^-$ -N y un  $R^2$  de 0,9994. Los porcentajes de recuperación para soluciones estándar de  $\text{KNO}_3$  se indican en la tabla 3.

**Tabla 3.** Porcentajes de recuperación en muestras de nitrato por el método de Forster.

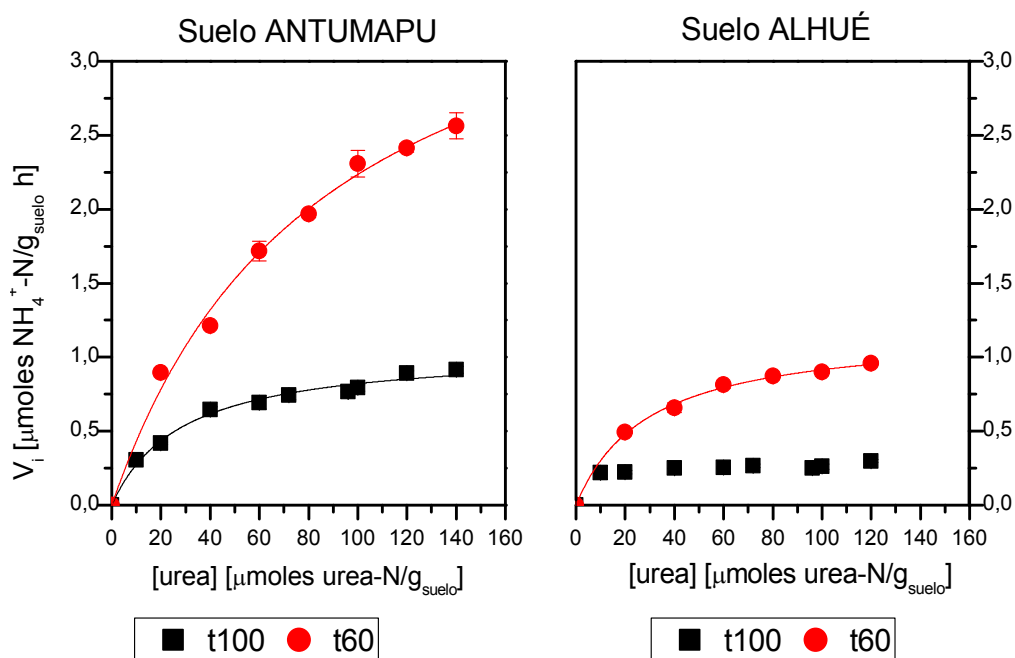
Muestra	Blanco sin suelo <sup>a</sup>		Antumapu <sup>b</sup>		Alhué <sup>b</sup>	
	100	300	100	300	100	300
[ $\text{KNO}_3$ ]	100	300	100	300	100	300
% Rec	$93,37 \pm 1,57$	$97,25 \pm 1,42$	$85,26 \pm 2,11$	$89,53 \pm 1,35$	$94,15 \pm 1,41$	$96,21 \pm 1,58$

<sup>a</sup> $[\mu\text{g NO}_3^-$ -N/mL]; <sup>b</sup> $[\mu\text{g NO}_3^-$ -N/g<sub>suelo</sub>].

### 3.6. Parámetros enzimáticos aparentes para la actividad ureásica de los microorganismos del suelo.

Las curvas de saturación de ureasa para ambos tratamientos (figura 11) poseen una cinética de saturación, lo que es consistente con lo informado en estudios previos para una amplia variedad de suelos (Kandeler & Gerber, 1988; Cartes y col, 2009).





**Figura 11.** Curvas de saturación de actividad ureásica en el suelo. Velocidad inicial de formación de amonio en función de la concentración de urea agregada. Valores corresponden al promedio de tres réplicas  $\pm$  EE. Tratamientos: t100: 100 % CRA (cuadrado); t60: 60 CRA (círculo). Las curvas corresponden al ajuste de una ecuación hiperbólica.

Los valores de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se obtuvieron a partir del ajuste no lineal de la ecuación hiperbólica  $\left( v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S]_{0,5} + [S]} \right)$  y también a partir del diagrama de Hanes – Woolf  $\left( \frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{[S]_{0,5}}{V_{m\acute{a}x}} \right)$  (Tabla 4).

En los dos suelos hay diferencias significativas entre tratamientos. En ambos casos los valores de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son mayores en t60 respecto a t100, mientras que al comparar los mismos tratamientos entre suelos se encontró que  $[S]_{0,5}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son mayores en el suelo Antumapu. Cabe hacer notar que no se pudo obtener el valor de  $[S]_{0,5}$  en t100 para el suelo Alhué porque no se pudo determinar la velocidad inicial para concentraciones menores a 10  $\mu\text{moles urea-N/g}_{\text{suelo}}$  debido a que estos valores están fuera del rango de detección del método. Sin embargo se puede observar que el valor de  $[S]_{0,5}$  es menor a 10  $\mu\text{moles urea-N/g}_{\text{suelo}}$ , que corresponde al menor valor observado.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos aparentes para la degradación de urea en suelos Antumapu y Alhué.

		ALHUÉ T100	ALHUÉ T60	ANTUMAPU T100	ANTUMAPU T60
<b>NO LINEAL</b>	$[S]_{0,5}^b$	< 10	29,25 ± 2,40	26,06 ± 3,55	85,01 ± 12,00
	$V_{máx}^a$	~ 0,25	1,18 ± 0,030	1,10 ± 0,06	4,16 ± 0,28
	$[S]_{0,5}/V_{máx}$	-	24,78 ± 1,46	25,55 ± 2,56	20,44 ± 1,54
<b>HANES - WOOLF</b>	$[S]_{0,5}^b$	6,83 ± 0,57	29,34 ± 0,09	26,91 ± 0,40	94,24 ± 0,09
	$V_{máx}$	0,29 ± 0,02	1,18 ± 0,03	1,11 ± 0,30	4,04 ± 0,06
	$[S]_{0,5}/V_{máx}$	23,54 ± 11,85	24,86 ± 1,75	26,13 ± 3,63	20,99 ± 1,67

<sup>a</sup> $V_{máx}$ :  $\mu\text{moles NH}_4^+ - \text{N}/\text{g}_{\text{suelo}}$  h. <sup>b</sup> $[S]_{0,5}$ :  $\mu\text{moles urea} - \text{N}/\text{g}_{\text{suelo}}$ .

De acuerdo al ANOVA de dos vías (Tabla 5) hay diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de sustrato y tratamientos utilizados en ambos suelos.

**Tabla 5.** Resultados del ANOVA de dos vías para el contenido de amonio del suelo en la curvas de saturación de ureasa.

		Suelo Antumapu			Suelo Alhué		
<b>Factores</b>		<b>% varianza</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>% varianza</b>	<b>P</b>	<b>F</b>
$\text{NH}_4^{+a}$	interacción	13,11 <sup>*b</sup>	< 0,0001	555	13,21 <sup>*b</sup>	< 0,0001	1185
	tratamiento	35,41 <sup>*b</sup>	< 0,0001	8997	43,73 <sup>*b</sup>	< 0,0001	19621
	concentración	51,37 <sup>*b</sup>	< 0,0001	2176	43,01 <sup>*b</sup>	< 0,0001	3860

<sup>a</sup> $\mu\text{g NH}_4^+ - \text{N}/\text{g}_{\text{suelo}}$ . <sup>\*</sup>diferencias estadísticamente significativas. <sup>b</sup>99,99 % IC.

En el suelo Alhué el factor tratamiento fue el causante de la mayor parte de la varianza total (43,73 %) junto con factor concentración (43,01 %), mientras que en el caso del suelo Antumapu la mayor parte de la varianza total proviene del factor concentración (51,37 %) seguido del factor tratamiento (35,41 %). Cabe mencionar que el factor interacción es similar en los suelos Alhué y Antumapu (13,21 y 13,11 % respectivamente), lo que muestra que la suma de las contribuciones de tratamiento y concentración aportan un peso similar a la varianza.

En el análisis de correlación entre la velocidad inicial y la concentración de urea (Tabla 6), se observa una fuerte correlación para el suelo Antumapu, la que es mayor en t60 ( $r = 0,9620$ ;  $P = 0,0001$ ). En el caso de Alhué las correlaciones son significativas pero con un menor IC, siendo más alta también en t60 ( $r = 0,8969$ ;  $P = 0,0062$ ).

**Tabla 6.** Correlaciones de Pearson entre la concentración de urea y la velocidad inicial de suelo Antumapu y Alhué.

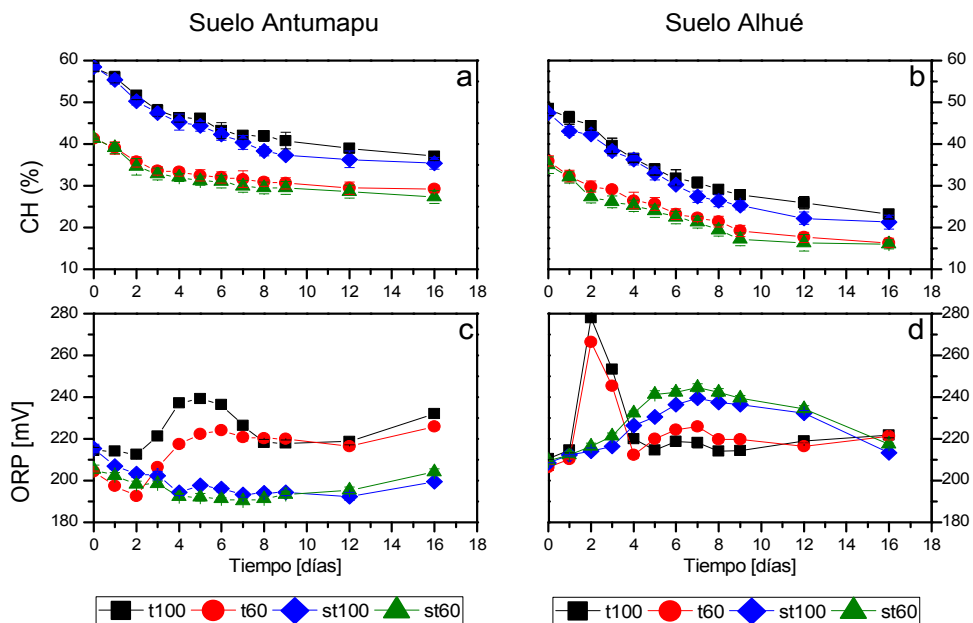
		Suelo Antumapu		Suelo Alhué	
		$V_i^a$		$V_i^a$	
		r	P	r	P
t100	[S] <sup>b</sup>	0,9061* <sup>c</sup>	0,0008	0,6914* <sup>d</sup>	0,0391
t60	[S] <sup>b</sup>	0,9620* <sup>c</sup>	0,0001	0,8969* <sup>f</sup>	0,0062

<sup>a</sup>velocidad inicial de formación de amonio ( $\mu\text{moles NH}_4^+ \text{-N/g}_{\text{suelo}} \text{ h}$ ). <sup>b</sup>Tratamientos: t100 (0 a 140  $\mu\text{moles urea-N/g}_{\text{suelo}}$ ) al 100 % CRA; t60: (0 a 140  $\mu\text{moles urea-N/g}_{\text{suelo}}$ ) al 60 % CRA. \*Correlaciones estadísticamente significativas. <sup>c</sup>99,9 % IC. <sup>d</sup>95,0 % IC. <sup>e</sup>99,0 % IC.

### 3.7. Parámetros edáficos y actividad nitrificante: curvas de progreso de las reacciones de formación de $\text{N-NH}_4^+$ y de $\text{N-NO}_3^-$ a partir de urea.

Los parámetros edáficos (CH, ORP, pH) fueron medidos diariamente durante los 9 primeros días y luego en los días 12 y 16. Los controles con suelo autoclavado no mostraron diferencias con su estado inicial durante los días 3 y 5, para ambos tratamientos. El contenido hídrico (CH) muestra una disminución gradual durante la incubación de los microcosmos obteniéndose valores de aproximadamente el 30% al final del período de incubación en los microcosmos del suelo Antumapu y de aproximadamente 15% para los microcosmos del suelo Alhué (figura 12a y 12b), lo que es esperable ya que el suelo ALH tiene una menor capacidad de retención de agua.

El potencial de óxido-reducción aumentó durante los primeros días de incubación en los microcosmos tratados y también en los microcosmos sin sustrato del suelo Alhué. En los suelos tratados con urea se observó un aumento en el ORP, entre los días 3 a 6 para Antumapu y 1 a 4 para Alhué, siendo mayor en el suelo Antumapu durante todo el período de incubación (figura 12c, 12d). Los valores de ORP de ambos suelos indican que los microcosmos tienen una condición levemente anaeróbicas durante todo el ensayo.

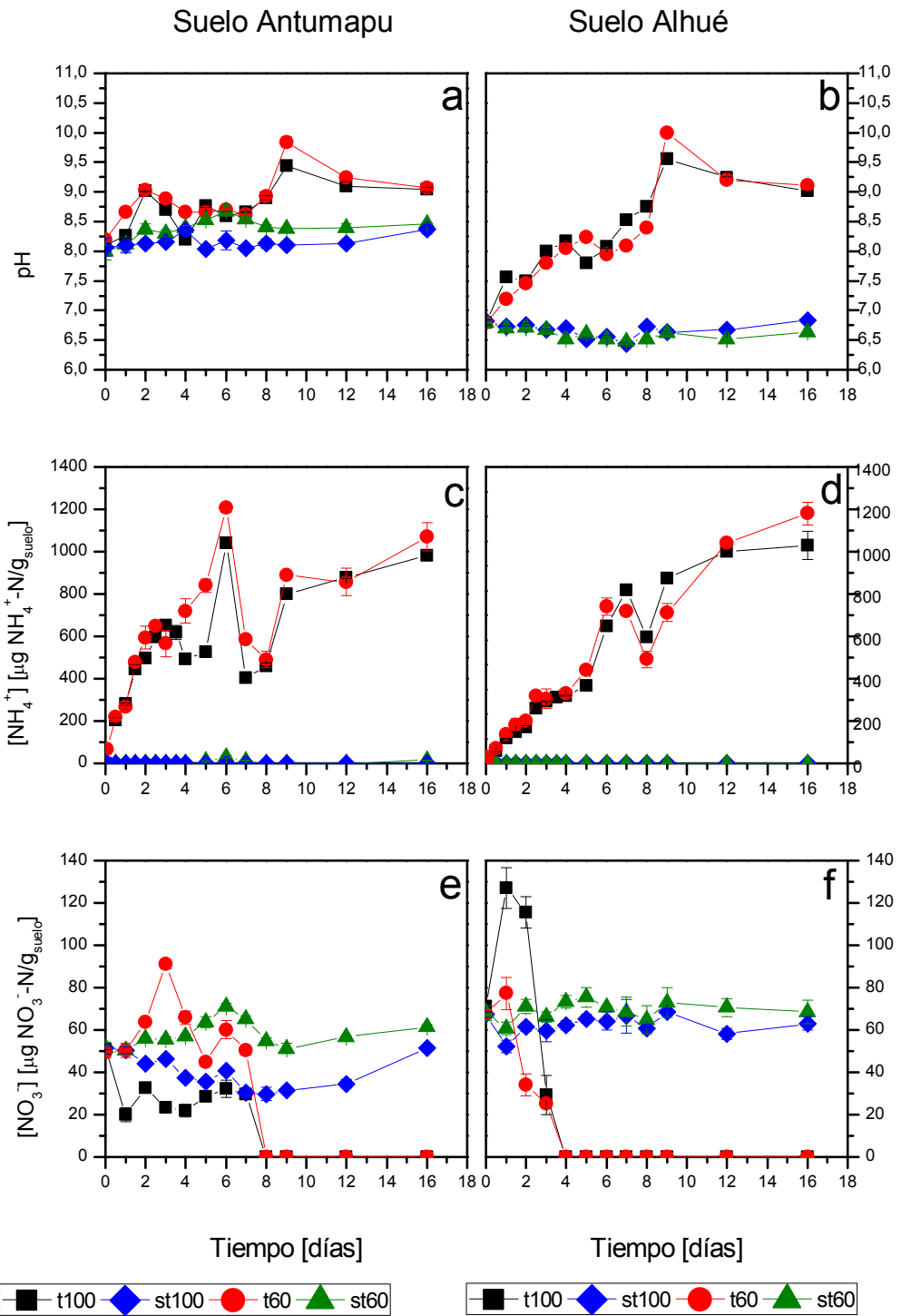


**Figura 12.** Contenido hídrico (CH) y potencial óxido reducción (ORP) en función del tiempo. Valores promedio (triplicado)  $\pm$  EE. Tratamientos: t100: urea 100 % CRA (cuadrado); st100: 100 % CRA sin sustrato (rombo), t60: urea 60 % CRA (círculo); st60: 60 % CRA sin sustrato (triángulo).

Las curvas de progreso de amonio y nitrato, junto con las curvas de pH se muestran en la figura 13. Las variaciones de pH (figura 13a, 13b) en los microcosmos tratados tanto a 60% y 100% de CRA pueden dividirse en tres etapas, donde al inicio de la incubación hay un aumento en el pH, luego entre los 4-7 días el pH se mantiene cercano a las 8 unidades y luego a partir del día 8 un aumento hasta las 10 unidades para luego descender moderadamente al final del período de incubación. En el caso de los microcosmos controles no presentaron cambios significativos del pH durante la incubación. Los datos muestran que la adición de urea produce un aumento de pH, ya que el amoniaco liberado actúa como base, siendo mucho mayor la alcalinización del suelo Alhué. La actividad de ureasa medida como producción de amonio se muestra en la (figura 13c, 13d). En los microcosmos tratados con urea se observa un aumento significativo del contenido de amonio a lo largo de la incubación comparado con el control sin sustrato para ambos porcentajes de la CRA.

En principio, hasta el día 6 para el suelo Antumapu y el día 7 para el suelo Alhué, se observa un aumento progresivo de la concentración de amonio y luego un estancamiento. Posteriormente, hay una segunda etapa a partir del día 8 que muestra un aumento en la tasa de formación de amonio, aunque menos pronunciado que la etapa inicial

Por su parte, el contenido de nitrato en los microcosmos con urea tiene un pequeño aumento en los primeros tiempos de incubación en el caso del suelo Antumapu ocurre con el 60% de CRA y el suelo Alhué con el 100% de CRA. Luego la concentración de nitrato cae a niveles no detectables (figura 13e y 13f) en todos los microcosmos con urea, a partir del día 8 en el suelo Antumapu y a partir del día 4 en el suelo Alhué, lo que puede estar relacionado con el ORP, ya que las condiciones del sistema son moderadamente anaeróbicas lo que podría favorecer la reducción del nitrato. Por el contrario, en los microcosmos controles la concentración de nitrato se mantiene a lo largo del tiempo de incubación siendo ligeramente superior en los microcosmos con un 60 % de CRA comparado con el microcosmos con 100% CRA. La ausencia de un aumento progresivo de la concentración de nitrato en los microcosmos sugiere que bajo las condiciones del ensayo no hubo actividad nitrificante, excepto en los primeros días. Sin embargo, la no detección de nitrato en los microcosmos tratados con urea no sólo indica ausencia de actividad nitrificante sino la pérdida de nitrato en el sistema (Figura 13e y 13f), el que debería haberse reducido a nitrito.



**Figura 13.** Curvas de progreso de pH, amonio y nitrato. Valores promedio (triplicado)  $\pm$  EE. Tratamientos: t100: urea 100 % CRA (cuadrado); st100: 100 % CRA sin sustrato (rombo), t60: urea 60 % CRA (círculo); st60: 60 % CRA sin sustrato (triángulo).

**Tabla 7.** Resultados del ANOVA de dos vías para los parámetros edáficos del suelo en las curvas de progreso.

	Factores	Suelo Antumapu			Suelo Alhué		
		% varianza	F	P	% Varianza	F	P
pH	interacción	4,49 <sup>*d</sup>	7,34	< 0,0001	2,95 <sup>*d</sup>	20,72	< 0,0001
	tratamiento	2,83 <sup>*d</sup>	50,9	< 0,0001	0,16 <sup>f</sup>	12,69	0,0016
	tiempo	91,34 <sup>*d</sup>	149,4	< 0,0001	96,57 <sup>*d</sup>	677,5	< 0,0001
NH <sub>4</sub> <sup>+a</sup>	interacción	2,95 <sup>*d</sup>	6,92	< 0,0001	1,29 <sup>*f</sup>	3,783	0,0011
	tratamiento	1,73 <sup>*d</sup>	56,73	< 0,0001	0,03	1,114	0,2997
	tiempo	94,41 <sup>*d</sup>	221,5	< 0,0001	97,95 <sup>*d</sup>	287,5	< 0,0001
NO <sub>3</sub> <sup>-b</sup>	interacción	15,80 <sup>*d</sup>	31,57	< 0,0001	10,34 <sup>*d</sup>	25,63	< 0,0001
	tratamiento	14,08 <sup>*d</sup>	309,6	< 0,0001	1,70 <sup>*d</sup>	59,04	< 0,0001
	tiempo	69,03 <sup>*d</sup>	137,9	< 0,0001	87,10 <sup>*d</sup>	215,9	< 0,0001
ORP <sup>c</sup>	interacción	12,90 <sup>*d</sup>	38,28	< 0,0001	3,02 <sup>*d</sup>	26,14	< 0,0001
	tratamiento	19,76 <sup>*d</sup>	644,8	< 0,0001	0,02	2,092	0,1546
	tiempo	67,14 <sup>*d</sup>	199,2	< 0,0001	96,45 <sup>*d</sup>	834,6	< 0,0001
% CH	interacción	3,27 <sup>*d</sup>	4,79	< 0,0001	2,17 <sup>*g</sup>	2,512	0,0138
	tratamiento	58,06 <sup>*d</sup>	937,2	< 0,0001	31,82 <sup>*d</sup>	405,1	< 0,0001
	tiempo	35,70 <sup>*d</sup>	52,38	< 0,0001	62,24 <sup>*d</sup>	72,03	< 0,0001

<sup>a</sup> μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. <sup>b</sup> μg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. <sup>c</sup> mV. \*diferencias estadísticamente significativas. <sup>d</sup>99,99 % IC. <sup>e</sup>99,0 % IC. <sup>f</sup>95,00 % IC.

Según el ANOVA de dos vías, utilizando tratamiento y tiempo de incubación como factores (Tabla 7), hubo diferencias estadísticamente significativas para todos los parámetros edáficos, excepto para el contenido de amonio en Alhué (factor tratamiento). El factor tiempo dio cuenta de la mayor parte de la varianza total en pH (91,34 y 96,57 % para Antumapu y Alhué respectivamente), contenido de amonio (94,41 y 97,95 %), contenido de nitrato (69,03 y 87,10 %), ORP (67,14 y 96,45 %). En el caso de CH esto se cumple para el suelo Alhué (62,24 %) pero en el suelo Antumapu corresponde al tratamiento la mayor contribución (58,06 %). Si bien en el caso del contenido de nitrato la mayor parte de la varianza es a causa del factor tiempo, es en este parámetro donde hay una mayor contribución del factor interacción (15,80 y 10,34 % para Antumapu y Alhué respectivamente). Además, la contribución del factor tratamiento es de un 14,08 % en Antumapu mientras que en Alhué es de 1,7 % (la más alta para este suelo después de CH).

En los análisis de correlación se observó una correlación significativa entre la disminución del CH con el aumento del contenido de amonio ( $r = -0,955$ ;  $P < 0,0001$  a  $r = -0,789$ ;  $P = 0,0023$ ) y con la disminución del contenido de nitrato ( $r = 0,838$ ;  $P = 0,0007$  a  $r = 0,736$ ;  $P = 0,0063$ ) para los dos suelos y tratamientos salvo

en el suelo Antumapu en t60 ( $r = 0,525$ ;  $P = 0,0795$ ) (tablas 8 y 9). En cuanto al pH, un aumento de este tuvo correlaciones significativas con la disminución de CH ( $r = -0,925$ ;  $P = 0,0001$ ) para ambos suelos y tratamientos, al igual que con la disminución del contenido de nitrato ( $r = -0,734$ ;  $P = 0,0066$  a  $r = -0,670$ ;  $P = 0,0171$ ) y con el aumento del contenido de amonio ( $r = 0,912$ ;  $P < 0,0001$  a  $r = 0,633$ ;  $P = 0,0272$ ), excepto para el suelo Antumapu en t60. Además, no hay una correlación significativa entre la disminución de humedad con el aumento del potencial redox excepto en el suelo Antumapu en t60.

**Tabla 8.** Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos de suelo Antumapu.

		Antumapu							
		pH		ORP		CH		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
		r	P	r	P	r	P	r	P
<b>t100</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,126	0,6975						
	% CH	-0,690 <sup>*g</sup>	0,0129	-0,423	0,1633				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0,633 <sup>*g</sup>	0,0272	0,421	0,1732	-0,789 <sup>*f</sup>	0,0023		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,686 <sup>*g</sup>	0,0138	0,029	0,9287	0,736 <sup>*f</sup>	0,0063	-0,565	0,0555
<b>t60</b>	ORP <sup>a</sup>	0,204	0,5252						
	% CH	-0,622 <sup>*g</sup>	0,0308	-0,766 <sup>*f</sup>	0,0036				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0,508	0,0919	0,674 <sup>*</sup>	0,0162	-0,809 <sup>*f</sup>	0,0014		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,570	0,0529	-0,473	0,1208	0,525	0,0795	-0,262	0,4102
<b>C100</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,208	0,517						
	% CH	-0,299	0,345	0,870 <sup>*e</sup>	0,0002				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	-	-	-	-	-	-		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	0,269	0,397	0,817 <sup>*f</sup>	0,0012	0,610 <sup>*g</sup>	0,0354	-	-
<b>C60</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,732 <sup>*f</sup>	0,0068						
	% CH	-0,799 <sup>*f</sup>	0,0018	0,571	0,0524				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0,713 <sup>*f</sup>	0,0093	-0,285	0,3700	-0,326	0,3019		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	0,851 <sup>*e</sup>	0,0005	-0,483	0,1114	-0,484	0,1105	0,909 <sup>*d</sup>	<0,0001

<sup>a</sup>mV. <sup>b</sup>μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. <sup>c</sup>μg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. \*diferencias estadísticamente significativas. <sup>d</sup>99,99 % IC. <sup>e</sup>99,9 % IC. <sup>f</sup>99,0 % IC. <sup>g</sup>95,0 % IC.



**Tabla 9.** Correlaciones de Pearson entre los parámetros edáficos de los microcosmos de suelo Alhué.

		Alhué							
		pH		ORP		CH		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
		r	P	r	P	r	P	r	P
<b>t100</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,241	0,4501						
	% CH	-0,925* <sup>e</sup>	0,0001	0,330	0,2957				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0,912* <sup>d</sup>	<0,0001	-0,287	0,3650	-0,955* <sup>d</sup>	<0,0001		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,670* <sup>g</sup>	0,0171	0,439	0,1531	0,834* <sup>e</sup>	0,0007	-0,714* <sup>f</sup>	0,0091
<b>t60</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,116	0,7204						
	% CH	-0,900* <sup>d</sup>	<0,0001	0,078	0,8107				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	0,796* <sup>f</sup>	0,0019	-0,109	0,7357	-0,944* <sup>d</sup>	<0,0001		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,734* <sup>f</sup>	0,0066	-0,053	0,8710	0,838* <sup>e</sup>	0,0007	-0,725* <sup>f</sup>	0,0076
<b>C100</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,735* <sup>f</sup>	0,0065						
	% CH	0,287	0,3652	-0,662* <sup>g</sup>	0,0191				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	-	-	-	-	-	-		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,312	0,3243	0,328	0,2987	-0,186*	0,5627	-	-
<b>C60</b>	ORP <sup>a</sup>	-0,735* <sup>f</sup>	0,0065						
	% CH	-0,849* <sup>e</sup>	0,0005	-0,624* <sup>g</sup>	0,0300				
	NH <sub>4</sub> <sup>+b</sup>	-	-	-	-	-	-		
	NO <sub>3</sub> <sup>-c</sup>	-0,345	0,2720	0,451	0,1414	-0,335	0,2872	-	-

<sup>a</sup>mV. <sup>b</sup>µg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. <sup>c</sup>µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/g<sub>suelo</sub>. \*diferencias estadísticamente significativas. <sup>d</sup>99,99 % IC. <sup>e</sup>99,9 % IC. <sup>f</sup>99,0 % IC. <sup>g</sup>95,0 % IC

## 4. DISCUSIÓN.

### 4.1. Evaluación del efecto de la capacidad de retención de agua y el contenido de carbono orgánico en los parámetros cinéticos aparentes de la actividad ureásica.

Al comparar los resultados obtenidos entre tratamientos para un mismo suelo se encuentra que estos siguen las tendencias descritas por Dalal, (1974), Antil y col. (1993), quienes indican que a medida que aumenta la humedad (desde el 50 % de la CRA) con la que es tratado el suelo, disminuye la actividad ureásica. Los resultados coinciden además con las condiciones óptimas para la actividad aeróbica en suelos, la que se encuentra entre 50 y 70 % de la CRA (Atlas & Bartha, 2001). Por otro lado, Sahrawat, (1984) ha indicado que no hay diferencias en la actividad ureásica al cambiar el porcentaje de la CRA del suelo, lo que es contradictorio a lo expuesto anteriormente. Al analizar las características de los suelos involucrados en los estudios mencionados se encuentra que no hay características que definan claramente la respuesta de la actividad ureásica, por lo que se podría asociar a factores bióticos como la abundancia o diversidad de la microbiota (Bustamante, 2010).

Los análisis de correlación arrojaron diferencias significativas con IC mayor o igual al 99,9 % sólo para el suelo Antumapu. Tal como se observa en la figura 11, en t100 hubo saturación de la enzima, no así en t60, lo que explica que si bien ambas correlaciones son significativas, esta sea mayor en t60 ya que la cinética de reacción aún es dependiente de la concentración de urea, a diferencia de t100 que al final de la curva la cinética es de orden cero. Para el caso del suelo Alhué, en t100 la curva muestra saturación desde el inicio, es decir, una cinética de orden cero por lo que es esperable obtener una correlación menor y un IC menor (95 %). En t60 la situación es parecida, sólo que la correlación entre la velocidad inicial y la concentración de urea es más fuerte, además el intervalo de confianza es mayor (99,0 %).

Los análisis de ANOVA mostraron que hay diferencias significativas entre tratamientos para ambos suelos. En el suelo Antumapu, el factor concentración fue el que mayor contribución tuvo en el % de varianza con un 51,37 %, en tanto que en Alhué hay una contribución similar por parte de los factores concentración (43,01 %) y tratamiento (43,73 %). Respecto al factor concentración, si se considera que a causa del bajo contenido de CO del suelo Alhué, las curvas se saturan a

concentraciones de urea menores que en Antumapu (cinética de orden cero), es esperable que este factor tenga una menor contribución en el suelo Alhué. Aún así, el factor tratamiento tiene una contribución importante en ambos suelos, lo que es consistente con los valores de los parámetros cinéticos aparentes determinados.

Otro aspecto importante a considerar en la evaluación del efecto de la CRA en los suelos estudiados es la diferencia de espacio poroso entre ambos. Si bien este parámetro no es un indicador del tipo de poros que posee un suelo, otorga una idea general de la textura del suelo, en particular, respecto a la capacidad de formación de microhábitats, junto con la difusión de gases y sustratos en el sistema (Atlas & Bartha, 2001). El efecto del factor tratamiento contribuye más a la varianza en Alhué que en Antumapu, lo que podría explicarse porque el suelo Alhué posee un menor espacio poroso, limitando la difusión de oxígeno y urea en t100.

En cuanto a los parámetros cinéticos aparentes, en el suelo Alhué en t100 hubo saturación desde los  $10 \mu\text{moles NH}_4^+ \text{-N/g}_{\text{suelo}}$ , lo que impidió determinar  $[S]_{0,5}$  ya que no se pudo obtener la velocidad inicial para concentraciones menores de sustrato (tabla 4). El hecho de que la actividad haya sido baja en este tratamiento se podría deber al bajo contenido de CO junto con el efecto de la saturación del suelo con agua, ya que la limitación de oxígeno disminuye la actividad metabólica de los microorganismos participantes en la degradación de urea. En cuanto al efecto del pH, ambos suelos poseen valores de pH levemente alcalinos, lejos del óptimo de la ureasa en la matriz suelo que se encuentra entre 9 y 12 (Kandeler & Gerber, 1988; Tabatabai & Bremner, 1972), lo que en conjunto con el corto tiempo de incubación no permite un aumento sustancial del pH que pueda provocar mayores variaciones en los resultados.

Al analizar las curvas de saturación de ureasa y los valores de los parámetros cinéticos aparentes, se encuentra que existe una amplia diferencia al comparar suelos para cada tratamiento. Es de interés notar que la curva de saturación del suelo Antumapu en t100 es similar a la de Alhué en t60 (valores similares de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{\text{máx}}$ ), lo que muestra que el porcentaje de la CRA que se utilice puede ser un factor útil para regular la actividad ureásica en suelos de uso agrícola, lo que podría permitir disminuir el uso de inhibidores de ureasa como tiourea o NBPT (N-(n-butil) triamida tiofosfórica).

Cuando se analizan las variaciones de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{\text{máx}}$  a causa del tratamiento, en ambos suelos se encuentra que ocurre una disminución de  $[S]_{0,5}$  y  $V_{\text{máx}}$  cuando se compara t60 respecto a t100. En el caso de la disminución de  $V_{\text{máx}}$  se puede

asociar directamente el efecto de la CRA en la difusión de oxígeno y sustrato, no así para  $[S]_{0,5}$ . El hecho de que exista una disminución del valor de  $[S]_{0,5}$  indica que ocurre un aumento en la afinidad de la enzima por el sustrato, es decir, que el complejo enzima-sustrato (ES) es más estable y prefiere mantenerse de esa forma que como sustrato y enzima libre.

Cuando la concentración de urea es mucho menor que  $[S]_{0,5}$ , el comportamiento de la velocidad inicial corresponde a una cinética de primer orden, donde el término constante de la expresión corresponde a la eficiencia catalítica.

$$v_i = \left( \frac{V_{m\acute{a}x}}{[S]_{0,5}} \right) [S]$$

Para cada suelo y su respectivo tratamiento, a partir del diagrama de Hanes – Woolf se obtuvo la constante  $[S]_{0,5}/V_{m\acute{a}x}$ , que corresponde al intercepto de la recta. Si este parámetro se compara de t100 respecto a t60, se observa una disminución en todos los casos.  $[S]_{0,5}/V_{m\acute{a}x}$  corresponde al inverso de la eficiencia catalítica, lo que significa que tratar un suelo al 60 % de la CRA en vez de al 100 % implica que la eficiencia catalítica del proceso es mayor (lo que se cumple siempre y cuando la concentración de enzima sea constante). A su vez, la eficiencia catalítica de la enzima es mayor en el suelo Antumapu, lo que nuevamente correlaciona con el alto contenido de CO de este suelo.

#### **4.2. Evaluación del efecto de la CRA, contenido de CO sobre la actividad ureásica y la actividad nitrificante.**

En los suelos tratados con urea no existe una tendencia clara en las correlaciones de Pearson entre CH y ORP (tablas 8 y 9), lo cual es comprensible ya que ningún parámetro edáfico se mantuvo constante durante las curvas de progreso, en particular la alcalinización del suelo debido a la adición de urea. En el caso de los controles la actividad nitrificante es marginal, lo que implica un menor consumo de oxígeno por parte de la microbiota y un pH relativamente constante a lo largo de la curva, lo que podría explicar que en cada suelo los controles tengan tendencias similares de correlación.

En cuanto al contenido de amonio de los controles, no hubo un aumento significativo. Respecto a la actividad nitrificante sólo se observó durante los primeros días y luego decayó, incluso por debajo de los controles. Esto muestra

que la adición de urea es la que acelera los distintos procesos de transformación del nitrógeno.

En los suelos esterilizados no hubo variaciones de amonio ni de nitrato entre los tiempos medidos respecto al estado inicial, lo que indica que todos los procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno son de origen microbiano. Por otro lado, Lloyd & Sheafe (1973) señalan que la adición de urea y glucosa al suelo promueve la producción de ureasa. La glucosa es una fuente de carbono fácilmente asimilable por los microorganismos, lo que nos da una aproximación al efecto del CO en la actividad microbiana, ya que no sólo basta que un suelo tenga un alto contenido de carbono orgánico para favorecer el crecimiento microbiano, sino que también es necesario que sea asimilable. Si bien se desconoce el tipo de CO del suelo, la apariencia física del suelo Antumapu es característica de los suelos altamente humificados, es decir, con un déficit de carbono ya que no es utilizable. Borie & Fuentealba (1982), indican que aunque la correlación entre actividad ureásica y recuento microbiano es media, encontraron que en los suelos con una alta actividad ureásica el recuento microbiano fue mayor.

Respecto a las curvas de progreso en los suelos tratados con urea, en el suelo Alhué el contenido de amonio aumenta linealmente desde el inicio de la curva y desde el día cuatro se produce un estancamiento (para ambos tratamientos), por lo que se puede decir que al menos hasta ese tiempo la actividad ureásica no se ve afectada por otros procesos que puedan ocurrir en simultáneo. Para el suelo Antumapu en ambos tratamientos, el aumento del contenido de amonio fue lineal hasta el día 2 y no se alcanzó a apreciar un estancamiento ya que hubo un pequeño descenso, el que coincidió con un aumento en el contenido de nitrato, lo que indica que la nitrificación y mineralización de urea están ocurriendo en simultáneo.

Al igual que en las curvas de saturación de ureasa, la actividad es mayor en el suelo Antumapu respecto a Alhué y en t60 comparado a t100. El suelo Antumapu posee no sólo un mayor contenido de CO que Alhué, también posee mayor volumen de poros y mayor CH, lo que puede favorecer la aireación del suelo y a la vez una suficiente disponibilidad de agua para los microorganismos en t60, favoreciendo la actividad pero hasta cierto punto ya que en t100, en los poros existe una mayor cantidad de agua respecto al aire, lo que desfavorece una adecuada difusión de oxígeno.

Las curvas de pH dan cuenta de que la capacidad amortiguadora del suelo Alhué es menor a la del suelo Antumapu, ya que con una menor actividad ureásica hubo un mayor aumento de pH, lo que probablemente esté relacionado con el contenido de CO en ambos suelos ya que la materia orgánica del suelo puede actuar como amortiguador porque posee en su estructura ácidos carboxílicos y fenoles (en forma aniónica debido al pH alcalino del medio). Se observó que la actividad ureásica no debería inhibirse por efecto del pH en el rango de estos experimentos, ya que se ha reportado que esto ocurre a pH superiores a 13 (Frankenberger & Johanson, 1982), por lo que cambios en la tendencia de la cinética enzimática esperada se pueden asociar a otras etapas del ciclo del nitrógeno ocurriendo al mismo tiempo.

El aumento lineal del contenido de amonio en el suelo Antumapu, para t60 coincide con un descenso en el ORP, lo que podría estar relacionado con que los microorganismos en su proceso de respiración hayan consumido oxígeno, ya que en este tratamiento la actividad ureásica es muy elevada. Sin embargo, en el suelo Alhué al inicio de la curva se observa un aumento muy pronunciado en el ORP, que también se observa en el suelo Antumapu posteriormente (en menor medida) y se mantiene en el tiempo, por lo que no se puede clarificar cómo las variables edáficas influyen en el comportamiento del ORP. Además no se debe olvidar que en ambos suelos hay una disminución de CH con el tiempo, lo que significa que a medida que se avanza en la curva de progreso los poros poseen cada vez más aire que agua, cosa que no se ve reflejada en los valores descendientes ORP (no hay correlación significativa en ningún caso).

Al analizar las curvas de nitrato se observan respuestas diferentes en todos los suelos y tratamientos. En el suelo Alhué se puede ver una alta actividad nitrificante para t100, pero prácticamente insignificante en t60 y ya al día 4 el nitrato no es detectable en este suelo. A diferencia de lo anterior, en el suelo Antumapu la mayor actividad nitrificante está en t60, aunque en sí es baja. Si se comparan los valores iniciales de pH de estos suelos se puede notar que la actividad nitrificante es mayor en valores cercanos a la neutralidad, tal como han reportado Flores (2010) junto con Nicol y col (2008). Sin embargo esto no explica la razón por la que en los cuatro casos hay respuestas diferentes ni por qué la mayor actividad se encuentra en Alhué, ya que debido a su bajo contenido de CO es de esperar una menor actividad si se compara con Antumapu. Para este análisis se debe considerar el contenido de amonio en el sistema y que la nitrificación es un proceso realizado por dos grupos diferentes de bacterias (bacterias oxidadoras de amonio y

bacterias oxidadoras de nitrito), cada una con distintos grados de tolerancia al contenido de amonio y a las variaciones de pH. Un alto contenido de amonio favorece la oxidación de amonio a nitrito pero a la vez inhibe la oxidación de nitrito a nitrato, por lo que es de especial importancia identificar cuándo el contenido de amonio comienza a ser tóxico para las bacterias oxidadoras de nitrito.

En la figura 13b se observa que la actividad nitrificante del suelo Alhué presenta diferencias apreciables entre ambos tratamientos. Las únicas diferencias apreciables entre estos tratamientos se encuentran en el contenido de amonio (ambos tratamientos cerca de los  $200 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}_{\text{suelo}}$ , poco mayor en t60) y en el % CH (mayor en t100). Por lo que se podría inferir que en condiciones levemente alcalinas y de igual CO, el amonio comienza a ser tóxico para las bacterias oxidadoras de nitrito alrededor de los  $200 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}_{\text{suelo}}$ .

En el caso del suelo Antumapu, la actividad nitrificante es baja respecto a Alhué. En este caso el contenido de amonio se encuentra cerca de los  $400 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N/g}_{\text{suelo}}$ , en ambos tratamientos y no hay diferencias apreciables entre tratamientos para el resto de los parámetros edáficos. En t100 no se detectó nitrificación, lo que sugiere que otros factores inciden en la oxidación de amonio a nitrato. Una opción podría ser que en caso de toxicidad por amonio, un aumento del % CH cobre importancia y limite la actividad nitrificante en condiciones de saturación hídrica. Por otro lado, no es descartable que en el suelo Antumapu la oxidación de amonio a nitrato esté incompleta, ya que a valores de pH superiores a 8 ocurre la inhibición tanto de la oxidación de amonio a nitrito como la de nitrito a nitrato. Considerando esto, en el caso del suelo Alhué, la inhibición sólo ocurriría en la oxidación de nitrito a nitrato, ya que las bacterias oxidadoras de nitrito son más sensibles al aumento de pH que las bacterias oxidadoras de amonio (Heil y col, 2016).

Por otro lado, en los peaks de la formación de nitrato se aprecia que al día siguiente hay un aumento significativo del ORP en ambos suelos y tratamientos, donde los mayores valores de ORP coinciden con la permanencia de nitrato en el sistema. Esto puede tener relación con que dichos valores de ORP más que favorecer la nitrificación, desfavorecen los procesos de desnitrificación, que son favorecidos por potenciales más bajos, aproximadamente a 300 mV, donde el aceptor principal de electrones pasa a ser el nitrato o nitrito en ausencia o escasez de oxígeno. Son estos últimos los que predominan como aceptores principales desde valores cercanos a 300 mV en adelante (DeLaune & Reddy, 2005).

Como era de esperar, no hubo actividad ureásica en los suelos control debido a que no había sustrato, mientras que la actividad nitrificante fue ínfima. En tanto, la actividad desnitrificante fue mayor al 100 % de la CRA para el suelo Antumapu, con el pH toda la curva cercano a 8 unidades. En el caso del control para el suelo Alhué, el pH se mantuvo cercano a la neutralidad. La diferencia más apreciable entre ambos suelos fue el ORP, más bajo en Antumapu, donde se observó una disminución del contenido de amonio en t100.

En el suelo Alhué desde el día 5 la velocidad de formación de amonio aumenta a la vez que disminuye el contenido de nitrato del sistema, sugiriendo que el amonio se está formando por otra vía además la actividad ureásica, que podría ser la mineralización de la materia orgánica o por reducción de nitrato. Además, el hecho de que en los controles el nitrato se mantenga en el sistema podría estar relacionado con el efecto del pH. Rütting y col (2011) han reportado que si bien el efecto del pH no es consistente con los procesos de reducción de nitrato y nitrito en el suelo, la capacidad de DNRA se ha asociado a condiciones fuertemente alcalinas. Si se considera como proceso de DNRA el aumento del contenido de amonio desde el día 8, el pH se mantiene por sobre las 9 unidades de pH en ese período de tiempo para ambos suelos, pero en ningún control.

Se debe considerar también la disminución de sustrato disponible por lo que se espera que la tasa de formación de amonio por actividad ureásica comience a disminuir. Sierra (2010) indica que la urea puede degradarse en un tiempo menor a 7 días para suelos con altos contenido de CO como Antumapu, pudiendo tardar hasta los 14 en suelos con contenidos más bajos como Alhué.

En los controles sin urea no hay actividad ureásica y el nitrógeno del sistema se mantiene en forma de nitrato. Sin embargo, respecto a la cantidad de urea agregada, el contenido de nitrato es despreciable a pesar del aumento del contenido de amonio. Además, el hecho de que en ambos suelos no se observe una recuperación total (en forma de  $\text{NH}_4^+$  más  $\text{NO}_3^-$ ) de la cantidad inicial de urea es consistente con que el nitrógeno del sistema tomó otras vías o que haya salido del sistema por volatilización en forma de  $\text{NH}_3$ , siendo esto último una opción probable por las condiciones fuertemente alcalinas del sistema (Casanova, 1995) o bien, que se haya acumulado como nitrito. El estudio de Van Cleemput & Samater (1996) muestra que en suelos tratados con urea, con un pH alcalino y con altas concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se produce la inhibición de la oxidación de nitrito a nitrato, lo que es consistente con lo que ocurre en ambos suelos ya que el



contenido de nitrato obtenido es muy bajo respecto al contenido inicial y al que estaba en forma de amonio.

Entre los días 6 y 8 en ambos suelos y tratamientos, el amonio disminuye pero no hay formación de nitrato, lo que sugiere que el amonio pudo volatilizarse o que su oxidación fue sólo hasta nitrito, o incluso ambas. También puede ser una muestra de que toda la urea del sistema se ha degradado. La concentración de amonio al final de las curvas junto con el bajo ORP (que indica condiciones levemente anaeróbicas) refuerzan la idea de que la oxidación hasta nitrito, intermediario en los procesos de reducción de nitrógeno, haya sido la vía mayoritaria y que este se haya reducido a  $N_2O$  y  $N_2$  o a amonio, o ambas.

Respecto a la capacidad de realizar DNRA y las características del suelo que inciden en este proceso, Rütting y col, (2011) han mencionado como las más importantes a las condiciones redox del sistema y la relación  $C/NO_3^-$ , donde en caso de condiciones de limitación de nitrato la DNRA se favorece en suelos con mayor  $C/NO_3^-$ . Sin embargo esto pierde sentido en los suelos tratados debido al escaso contenido de nitrato, lo que lleva a obtener valores de la razón  $C/NO_3^-$  muy elevados (9062 y 371 para Antumapu y Alhué respectivamente), por lo que se puede decir que en ambos suelos hay limitación de nitrato y que en Alhué hay limitación de carbono orgánico. Otros autores indican que el factor determinante es el contenido y el tipo de carbono orgánico (Fazzolari & Germon, 1991) debido a que en la etapa de reducción de nitrito en la DNRA es fermentativa (Moreno-Vivián & Ferguson, 1988), donde una fuente de carbono aprovechable será la que regule la población de bacterias capaces de realizar DNRA (Tiedje y col, 1988).

A partir de los resultados obtenidos para los ANOVAs de dos vías (Tabla 7), lo que más destaca es la contribución del factor tiempo a la varianza, donde en la mayoría de los parámetros supera el 90 %, mientras que en el caso del factor tratamiento la contribución no supera el 5 % en la mayoría de los parámetros. Es por esto que destaca el contenido de nitrato (para ambos suelos), ya que la contribución del factor tiempo disminuye notoriamente así como la del factor tratamiento aumenta la suya en el caso del suelo Antumapu. En el caso de Alhué, si bien posee un valor pequeño (1,7 %), sí existen diferencias significativas entre los tratamientos, lo que no ocurre con el contenido de amonio ni ORP. Esto podría ser un indicador de la alta sensibilidad a las variables edáficas que caracteriza a las comunidades nitrificadoras, lo que podría tener relación con las diferentes respuestas que hubo entre suelos y tratamientos. Es de especial interés debido a que pequeñas variaciones de los parámetros y sus posibles combinaciones dan un

amplio rango de posibilidades, lo que en muchas ocasiones dificulta el diseño experimental. Por otro lado, al comparar la contribución del factor tratamiento entre los distintos suelos, se observa claramente que el suelo Alhué es menos sensible a estos que Antumapu, ya que en la mayoría de los casos no supera el 1 %. Comparando a grandes rasgos estos suelos, si bien existen diferencias entre los parámetros edáficos, estas no son demasiado grandes excepto en el contenido y tipo de CO, por lo que diferentes respuestas a los tratamientos se podrían asociar a la composición de las comunidades microbianas.

Al analizar el efecto del porcentaje de retención de agua en las curvas de progreso, se encuentran diferencias estadísticamente significativas. Las curvas siguen tendencias similares pero se diferencian en los contenidos de amonio y nitrato. En el proceso de degradación por ureasa, un mayor contenido de humedad ralentizó la reacción para ambos suelos. Sin embargo, la humedad tuvo efectos dispares en los procesos de reducción de nitrato. En el caso del suelo Alhué, con un bajo contenido de CO, el nitrato dejó de ser detectable antes en el suelo con mayor porcentaje de CRA (100%), mientras que en Antumapu, un suelo con alto contenido de CO, el nitrato fue detectable en ambos tratamientos hasta la primera semana de incubación, por lo que se puede asociar a la humedad un papel determinante en la degradación de urea en suelos y las transformaciones de sus productos de degradación, ya que si bien los suelos son tratados a distintos porcentajes de retención de agua, la disponibilidad de agua es diferente y cada etapa del ciclo del nitrógeno involucra distintas variables que van desde las características propias del suelo y las variables ambientales.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con otros estudios en lo que respecta a actividad ureásica y su relación con el efecto de la CRA: cuando la humedad no es limitante, un incremento en ella ralentiza la degradación de urea, disminuyendo la velocidad máxima de reacción y la constante de semisaturación de la ureasa. Además se mostró que para cada suelo tratado a un determinado porcentaje de retención de agua, existe una constante de afinidad única para la ureasa ( $V_{m\acute{a}x}/[S]_{0,5}$ ), lo que es de especial utilidad para el diseño de nuevas estrategias experimentales que impliquen reacciones realizadas por microorganismos.

En cuanto a la actividad de nitrificación el efecto de la CRA no es claro. Esto coincide con algunos estudios que muestran que la actividad nitrificante puede disminuir (Vasileiadis y col, 2012) a medida que disminuye la CRA, mientras que en otros casos se da que la respuesta es opuesta, es decir, depende de los

parámetros edáficos y de cómo las comunidades microbianas del suelo se adaptan al ambiente. Se debe hacer hincapié en que si bien la CRA del suelo es una variable que regula la actividad microbiana, todos los parámetros edáficos inciden en la actividad e interactúan entre sí, por lo que ninguna variable por sí sola puede definir el comportamiento del sistema en su totalidad. Sin embargo, es posible obtener información útil y de interés ambiental.

En primer lugar, los resultados de este trabajo indican que mayores porcentajes de retención de agua son capaces de ralentizar la degradación de urea en suelo, al punto de obtener curvas de saturación de ureasa muy similares entre dos suelos muy distintos, como lo es un suelo de uso agrícola como Antumapu y uno muy deteriorado como Alhué. Sin embargo, se debe observar con cuidado ya que la curva de saturación utiliza velocidades iniciales, es decir, velocidades determinadas en períodos de tiempo cortos (máximo 24 horas), de modo que se obtenga una concentración mínima de amonio y poca variación de parámetros edáficos como pH, ORP, % CH, así como la formación de otras formas de nitrógeno que se originan en el ciclo. Considerando lo anterior, a priori se puede considerar el uso de regulación del porcentaje de retención de agua en conjunto con inhibidores de ureasa, de modo que se pueda disminuir en parte el uso de inhibidores, debido a la ralentización de la degradación de urea por saturación hídrica.

Se debe evitar saturar el suelo por un tiempo prolongado, ya que esto produce condiciones anaeróbicas en el suelo, que dependiendo de la dosis de urea, puede favorecer una alta desnitrificación, donde el óxido nítrico y nitroso salen del suelo por volatilización, llevando a una pérdida importante del fertilizante, disminuyendo su eficiencia, contribuyendo a la destrucción de la capa de ozono y a la formación de ozono troposférico. Por otro lado, los resultados de este trabajo muestran que se debe dar importancia a la DNRA, que ocurre en condiciones similares a la desnitrificación y que compite por el nitrato, con la gran ventaja de conservar el nitrógeno en el suelo y podría ayudar a aumentar la eficiencia de los fertilizantes amoniacales, aunque no se debe olvidar que al igual que todas las etapas del ciclo, estas deben ser reguladas y estudiadas adecuadamente, ya que una elevada DNRA puede resultar tóxica para las plantas, aumentar el pH y promover la acumulación de nitrito, también tóxico, a la vez que puede contribuir a un desequilibrio biogeoquímico respecto a la salida de nitrógeno molecular. Si bien aún no existe consenso total acerca de los factores que determinan la partición entre desnitrificación y DNRA, el ciclo del nitrógeno destaca por su potencial contaminación ambiental de origen agrícola en cada una de sus etapas.

En este sentido, es de importancia la creación y actualización constante de líneas de base del suelo, tanto a nivel físicoquímico como microbiano, con el objetivo de poseer la mayor cantidad de información para su correcto estudio y contribuir a la preservación de un recurso cada vez más escaso.

## 5. CONCLUSIONES.

1. En las curvas de saturación de ureasa, a menor contenido de carbono orgánico (suelo Alhué) aumenta la contribución a la varianza del porcentaje de retención de agua (tratamiento), mientras que a mayor contenido de carbono orgánico (suelo Antumapu) aumenta la contribución a la varianza del factor concentración de urea.
2. En ambos suelos, al 100 % de la capacidad de retención de agua, los parámetros cinéticos aparentes (velocidad máxima y constante de semisaturación) disminuyen de forma no proporcional, por lo que disminuye su eficiencia catalítica, mientras que a mayor contenido de carbono orgánico aumenta su eficiencia (suelo Antumapu).
3. En las curvas de progreso del contenido de amonio, en ambos suelos la actividad ureásica correlaciona fuertemente con un alto contenido de carbono orgánico, un alto valor de pH y en menor medida, con un menor porcentaje de retención de agua, lo que favorece la actividad ureásica de Antumapu respecto a Alhué.
4. En las curvas de progreso del contenido de nitrato, en ambos suelos la actividad nitrificante correlaciona negativamente con altos valores de pH y alto contenidos de amonio, lo que desfavorece la actividad nitrificante de Antumapu frente a Alhué. El efecto del porcentaje de retención de agua no es claro y el del contenido de carbono orgánico poco relevante. Es probable que en ambos suelos la nitrificación haya sido parcial, interferida por el bajo potencial redox y pH alcalino.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Antil, R. S., Gupta, A. P., & Narwal, R. P. (1993). Effect of substrate concentration, soil moisture, and organic amendments on urease activity of soil containing variable nickel amounts. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 7(4), 381-387.
2. Atlas R. M., R. Bartha. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4° Edición. Addison Wesley, Madrid.
3. Beri, V., Goswami, K. P., & Brar, S. S. (1978). Urease activity and its Michaelis constant for soil systems. *Plant and Soil*, 49(1), 105-115.
4. Bernier, R. y Alfaro, M. (2006). *Acidez de los Suelos y Efecto del Encalado*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA. Osorno, Chile. Boletín INIA N° 151, 46p.
5. Borie, F. & Fuentealba, R. (1982). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. II. Actividad ureásica. *Agricultura técnica*, 42(2), 135-142.
6. Bottomley, P. J. y Myrold, D. D. (2015). Biological N Inputs En: Eldor A. Paul (Ed.) *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* (pp. 447-470).
7. Bremner, J. M., & Chai, H. S. (1989). Effects of phosphoroamides on ammonia volatilization and nitrite accumulation in soils treated with urea. *Biology and Fertility of Soils*, 8(3), 227-230.
8. Bustamante, M. (2010). Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad de bacterias oxidadoras de amonio de suelos áridos. Tesis de Pregrado en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 64 pp.
9. Campillo, R. y Rodríguez, J. (1984). Efecto acidificante de las transformaciones de la urea en dos andisoles de la región de Los Lagos. *Agricultura Técnica (Chile)*, 44(2), 131-138.
10. Cartes, P., Jara, A. A., Demanet, R. y Mora M. (2009). Urease activity and nitrogen mineralization kinetics as affected by temperature and urea input rate in southern chilean andisols. *J. Soil. Sc. Plant Nutr.*, 9(1)69-82.
11. Casanova, M. y Benavides, C. (1995). Actividad de la ureasa en suelos de la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 55(2), 154-158.
12. Casanova, M. y Benavides, C. (2009). Cartografía de las pérdidas potenciales de N-urea por volatilización en suelos de Chile central. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 9(1), 14-25.

13. Coyne, M. S. y Frye, W. W. (2005). Nitrogen in soils En: Daniel Hillel (Ed.) Encyclopedia of Soils in the Environment (pp. 13-56). Tomo 3.
14. Chien, S. H., Prochnow, L. I., & Cantarella, H. (2009). Chapter 8 Recent Developments of Fertilizer Production and Use to Improve Nutrient Efficiency and Minimize Environmental Impacts Advances in Agronomy (Vol. Volume 102, pp. 267-322): Academic Press.
15. Dalal, R. C. (1975). Urease activity in some Trinidad soils. Soil Biology and Biochemistry, 7(1), 5-8.
16. DeLaune, R. D. y Reddy, K. R. (2005). Redox Potential En: Daniel Hillel (Ed.) Encyclopedia of Soils in the Environment (pp. 366-371). Tomo 3.
17. Doelman, P., & Haanstra, L. (1986). Short- and long-term effects of heavy metals on urease activity in soils. Biology and Fertility of Soils, 2(4), 213-218.
18. Domínguez, V., Irisarri, P. y Gonnet, S. (2007). Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación. Agrociencia, 11(2), 50-57.
19. Fageria, N. K. y Baligar, V. C. (2005). Nutrient Availability En: Daniel Hillel (Ed.) Encyclopedia of Soils in the Environment (pp. 63-71). Tomo 3.
20. Fazzolari Correa, E., and Germon, J. C. (1991). Dissimilative nitrate reduction to ammonium in different soils in waterlogged conditions, En: Diversity of Environmental Biogeochemistry, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 295-308.
21. Fazzolari, E., Nicolardot, B., and Germon, J. C. (1998). Simultaneous effects of increasing levels of glucose and oxygen partial pressures on denitrification and dissimilatory reduction to ammonium in repacked soil cores. European Journal Soil Biology 34, 47-52.
22. Forster JC. 1995. Soil sampling, handling, storage and analysis. *In*: Alef K, P Nannipieri (Eds). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press Ltd., London, England. Academic Press, London, pp. 49-121.
23. Frankenberger, W. T., & Johanson, J. B. (1982). A. D. McLaren Memorial Issue Effect of pH on enzyme stability in soils. Soil Biology and Biochemistry, 14(5), 433-437.
24. Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E. B., & Cosby, B. J. (2003). The Nitrogen Cascade. BioScience, 53(4), 341-356.
25. Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A.,

Karl, D. M., Michaels, A. F., Porter, J. H., Townsed, C. J., Vöosmarty, C. J. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226.

26. Havlin, J. L. (2005). Fertility En: Daniel Hillel (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 10-19). Tomo 2.

27. He, J., Hu, H. and Zhang, M (2012). Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 55, 146-154.

28. Heil, J., Vereecken, H. and Brüggemann, N. (2016). A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. *Eur J Soil Sci*, 67: 23-39.

29. Organización Metereológica Mundial/Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (1992). *Cambio Climático: Las evaluaciones del IPCC de 1990 y 1992*. 184p.

30. Kandeler, E., & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1), 68-72.

31. Lloyd, A. B. & J. Sheaffe. (1973). Urease activity in soils. *Pl. Soil* 39:71-80.

32. McGarry, S. J., O'Toole, P., & Morgan, M. A. (1987). Effects of Soil Temperature and Moisture Content on Ammonia Volatilization from Urea-Treated Pasture and Tillage Soils. *Irish Journal of Agricultural Research*, 26(2/3), 173-182.

33. Moreno-Vivián, C. & Ferguson, S. J. (1998). Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Molec. Microbiol.*, 29(2), 661-669.

34. Nicol, G. W., S. Leininger, C. Scheleper, J. I. Prosser. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol* 10:2966-2978.

35. O'Toole, P., & Morgan, M. A. (1984). Thermal stabilities of urease enzymes in some irish soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(5), 471-474

36. Powlson, D. S. & Addiscott, P. M. (2005). Nitrates En: Daniel Hillel (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 21-31). Tomo 3.

37. Robarge, W. P., Edwards, A., & Johnson, B. (1983). Water and waste water analysis for nitrate via nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 14(12), 1207-1215.



38. Robertson, G. P. y Groffman, P. M. (2015). Nitrogen Transformations En: Eldor A. Paul (Ed.) Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry (pp. 421-446).
39. Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., & Klemedtsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8(7), 1779-1791.
40. Sadzawka, A., Carrasco, M. A., Grez, R., Mora, M., Flores, P. y Neaman, A. (2006). Métodos de análisis recomendados para suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA N° 34, Santiago, Chile.
41. Sahrawat, K. L. (1984). Effects of temperature and moisture on urease activity in semi-arid tropical soils. *Plant and Soil*, 78(3), 401-408.
42. Scherer, H. W. (2005). Fertilizers and Fertilization En: Daniel Hillel (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 20-26). Tomo 2.
43. Sierra, Carlos. (2010). La urea: características, ventajas y desventajas de esta fuente nitrogenada [en línea]  
< <http://www2.inia.cl/medios/intihuasi/documentos/informativos/Informativo-35.pdf>> [Consulta, octubre 2015].
44. Smith, K. A. (2005). Greenhouse gas emissions En: Daniel Hillel (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 145-153). Tomo 2.
45. Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1972). Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4), 479-487.
46. Tabatabai, M. A. (1973). Michaelis Constants of Urease in Soils and Soil Fractions1. *Soil Science Society of America Journal*, 37(5).
47. Tiedje, J. M., Sexstone, A. J., Myrold, D. D., and Robinson, J. A. (1982). Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 48, 569-583.
48. Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, en: Zehnder, A. J. B (Ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms* (pp 179-244, 1988).
49. Van Cleemput, O., & Samater, A. (1995). Nitrite in soils: accumulation and role in the formation of gaseous N compounds. *Fertilizer research*, 45(1), 81-89.
50. Vasileiadis, S., Coppolecchia D., Puglisi, E., Balloi, A., Mapelli, F., Hamon, RE, Daffonchio, D. and Trevisan M (2012). *Microbial Ecology*, 64(4),1028-1037.
51. Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H. y Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the

global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7(3), 737-750.

52. Witt, C. & Haefele, S. M. (2005). Paddy Soils En: Daniel Hillel (Ed.) *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 141-150). Tomo 3.

53. IFA DATA. Consumo de fertilizantes nitrogenados en Chile <<http://ifadata.fertilizer.org/ucResult.aspx?temp=20180108100624>> [Consulta 8 de Enero]

54. Yang, J. E., Kim, J. J., Skogley, E. O., & Schaff, B. E. (1998). A Simple Spectrophotometric Determination of Nitrate in Water, Resin, and Soil Extracts. *Soil Science Society of America Journal*, 62:1108-1115.

55. Yin, S. X., Chen, D., Chen, L. M., & Edis, R. (2002). Dissimilatory nitrate reduction to ammonium and responsible microorganisms in two Chinese and Australian paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1131-1137.

56. Zhengping, W., Van Cleemput, O., & Baert, L. (1996). Movement of urea and its hydrolysis products as influenced by moisture content and urease inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1-2), 101-108.