

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo



Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo

Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo

María Elena Castelán · Claudina María Hack
Miriam Porta · Cristina Esther Sotelo

COORDINADORAS

Silvia A. Arzuaga · Karina R. Ávalos Llano
Natalia Banegas · Sebastián Carnicer
Mónica M. Collavino · Stella M. Contreras Leiva
Amilcar Correa · Marcela R. Cossoli
Mario R. Delfino · Mariana Ferrerira
Daniela González · Daniel H. Grasso
María C. Iglesias · Natalia Mansilla
Cecilia Martin · Gernán L. Pérez
José M. Recalde · Amalia M. E. Romero
Julieta Rojas · Matías H. Serafini
Andrea A. Sirio · Cristina E. Sotelo
Marcela Toledo · Emilce Viruel

Metodologías microbiológicas de indicadores ambientales de suelo / Silvia A. Arzuaga ... [et al.]; coordinación general de María Elena Castelán ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Corrientes : Editorial de la Universidad Nacional del Nordeste EUDENE ; Instituto Agrotécnico Pedro M. Fuentes Godo, 2022. Libro digital, PDF - (Ciencia y técnica)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-656-211-3

1. Técnicas de Análisis. 2. Microbiología. 3. Suelos. I. Arzuaga, Silvia A. II. Castelán, María Elena, coord.

CDD 577.57

Edición: Irina Wandelow

Corrección: Facundo Alarcón / Irina Wandelow

Diseño y diagramación: Julia Caplan



© EUDENE. Coordinación de Comunicación Institucional, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, 2023.

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723.
Reservados todos los derechos.

25 de Mayo 868 (cp 3400) Corrientes, Argentina.
Teléfono: (0379) 4425006
eudene@unne.edu.ar / www.eudene.unne.edu.ar

Capítulo 5. Nitrógeno mineralizado en anaerobiosis (Nan). Método de incubación anaeróbica

Silvia A. Arzuaga, Cristina E. Sotelo,
Stella M. Contreras Leiva y Marcela Toledo

Las formas orgánicas de nitrógeno (N) constituyen hasta el 90% del N total en la capa arable de los suelos minerales. A pesar de la gran cantidad de N que se encuentra en el suelo, se estima que solo del 1 al 3% del total del N orgánico es mineralizado (Keeney y Nelson, 1982). Su transformación a formas asimilables por las plantas es uno de los aspectos de mayor importancia desde el punto de vista productivo, económico y ambiental.

En ambientes frágiles, zonas áridas, semiáridas y subhúmedas, el N proviene de la mineralización del N orgánico, los residuos de las cosechas, enmiendas orgánicas, además del N inorgánico residual de años anteriores, en tanto que en ambientes templados y húmedos lo hace casi con exclusividad del N que se mineraliza durante la temporada de cultivo (St. Luce *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2018).

La mayoría de las estimaciones de la contribución de N por mineralización del suelo se basa en las incubaciones aeróbicas durante largos períodos (Stanford y Smith, 1972). Estos procedimientos de incubación aeróbica proporcionan condiciones óptimas de temperatura, humedad y aireación para la población microbiana responsable de la mineralización del N orgánico del suelo en la mayoría de las condiciones de campo. La principal desventaja de los procedimientos aeróbicos es la dificultad de mantener un contenido óptimo de agua en el suelo durante la incubación. Una segunda desventaja es la necesidad de medir las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- después de la incubación.

Se han propuesto numerosos índices que posibilitan la estimación de la disponibilidad de N a partir de análisis químicos y biológicos, sencillos y que demandan poco tiempo (Keeney y Nelson, 1982; Griffin, 2008), pero solo algunos han brindado resultados

satisfactorios. Existen otros métodos para estimar la cantidad de N que puede ser liberada de la materia orgánica (MO) mediante el balance de masa de N, como los métodos de campo de Meisinger (1984) y de García y Davedere (2007).

Waring y Bremner (1964) propusieron un procedimiento de incubación anaeróbica como una alternativa más simple y rápida a las incubaciones aeróbicas. Realizar la incubación en condiciones de anegamiento elimina la necesidad de establecer y mantener un contenido estándar de agua del suelo durante la incubación. Otra ventaja es que se evita la nitrificación y todo el N mineralizado durante la incubación estará en forma de NH_4^+ . La mineralización se produce en condiciones anaeróbicas, y la inmovilización puede reducirse en comparación con las condiciones aeróbicas debido a la reducción de la eficiencia energética, ya que el carbono (C) no se oxida completamente a CO_2 . Esta diferencia en la eficiencia energética no cambia fundamentalmente la mineralización de N (Drinkwaters *et al.*, 1996).

La determinación del contenido de N-NH_4^+ producido en incubación anaeróbica (Nan) sería un indicador confiable para estimar el aporte de N por mineralización, dado que se correlaciona estrechamente con el N potencialmente mineralizable (Npm) (Soon, Haq y Arshad, 2007). El Npm es la fracción del N orgánico considerada como una estimación estandarizada de la mineralización potencial del suelo (Curtin y Campbell, 2008 citado por Martínez *et al.*, 2016). Según Fabrizzi, Morón y García (2003), las incubaciones anaeróbicas de suelo (Nan) son importantes debido a la sensibilidad del método para observar cambios que se producen en el suelo debido al manejo. Además, sus valores se asemejan a los obtenidos por incubaciones aeróbicas de largo plazo, por lo que el Nan ha sido propuesto como el mejor indicador del N potencialmente mineralizable (Martínez *et al.*, 2018).

Para el sudeste bonaerense, Echeverría, Bergonzi y Ferrari (2000) obtuvieron una estrecha correlación entre el Nan y el Npm, y destacaron la ausencia de problemas relacionados con el ajuste a condiciones óptimas de humedad durante la incubación y el bajo requerimiento de aparatos y reactivos (Benintende *et al.*, 2007). Es interesante mencionar que el corto período de incubación de las muestras de suelo (7 días a 40 °C) respecto a otras metodologías representa una gran ventaja y facilita su utilización como método de rutina. Dada la sencillez de su determinación, su sensibilidad a los cambios a mediano y largo plazo producidos por el uso del suelo, y su relación con algunos procesos del suelo como el suministro de N, el Nan coincide con las características requeridas para ser utilizado como indicador de calidad, salud del suelo (Doran y Parkin, 1994; Domínguez *et al.*, 2016).

El conocimiento sobre la fracción de nitrógeno de la materia orgánica, susceptible a la mineralización, puede ayudar a optimizar el manejo de fertilizantes nitrogenados (Franzluebbers, 2016). Martínez *et al.* (2018), aplicando el indicador biológico Nan, detectaron que es el método que mejor explica la mineralización de N, pero sugieren que para mejorar el ajuste de este indicador sería apropiado incluirlo en regresiones múltiples con otros índices y parámetros tanto edáficos como climáticos. En los suelos del sudeste bonaerense estudiados por estos autores, las fracciones granulométricas tienen gran importancia en los procesos de mineralización del suelo.

Según Reussi-Calvo *et al.* (2014), la incorporación del Nan a los modelos tradicionales de diagnóstico de N en trigo permitió mejorar la estimación del rendimiento del testigo y la exportación de N en grano, respecto de utilizar solo N-NO_3^- como indicador de la fertilidad nitrogenada. Con esta información desarrollaron un modelo para predecir la respuesta a N y la dosis de N en función de la suma de las precipitaciones durante el ciclo del trigo, el rendimiento del testigo y el Nan, sugiriendo que el modelo debería ser validado para otras regiones productoras de trigo.

5.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La mineralización del nitrógeno es el proceso bioquímico mediante el cual los microorganismos del suelo obtienen la energía necesaria para realizar sus procesos metabólicos. El mismo se realiza mediante la ruptura de los enlaces de las macromoléculas orgánicas para transformarlos en amoníaco (NH_3^+) o ion amonio (NH_4^+).

Se distinguen dos procesos en la mineralización: la amonificación y la nitrificación. En la amonificación actúan innumerables grupos de bacterias, hongos, actinomicetes, protozoos y algas, siendo un proceso sin especificidad de sustratos ni microorganismos. Es por eso que las condiciones ambientales son diversas y se puede producir amonificación tanto en aerobiosis como anaerobiosis. Ese amoníaco que queda disponible en este proceso lo utilizan como sustrato de microorganismos específicos para la nitrificación, que se realiza únicamente en aerobiosis (Frioni, 1999).

Waring y Bremner (1964) también propusieron un método biológico para estimar el Npm, que se basa en una incubación anaeróbica corta a 40 °C, metodología que ha sido recomendada luego por autores como Gianello y Bremner (1986). El N-NH_4^+ , producido durante un corto período anaeróbico de incubación (Nan), es extractado con cloruro de potasio (ClK) y luego destilado. Esta

destilación es recogida en ácido bórico más indicador, para luego determinar el N-NH_4^+ de la muestra por medio de una tritación con ácido sulfúrico diluido (exactamente valorado). Es importante mencionar además que, para conocer el valor del Nan (Gianello y Bremner, 1986; Mulvaney, 1996), hay que realizar la extracción del nitrógeno inicial (N-NH_4^+ del suelo sin incubar). La diferencia entre ambos permitirá determinar el nitrógeno orgánico mineralizado anaeróbicamente (Nan), proveniente de la materia orgánica lábil.

Esta variable Nan ha sido propuesta como un estimador rápido y preciso de Npm, ya que existe una alta correlación entre ellos (Echeverría *et al.*, 2000; Soon, Haq y Arshad, 2007).

5.2. Objetivo de la determinación

La determinación del nivel de nitrógeno mineralizado en el suelo puede proporcionar una estimación del nitrógeno disponible del mismo. Se lo puede definir como la fracción del nitrógeno orgánico convertido a formas disponibles para las plantas –o minerales– bajo condiciones específicas de temperatura, humedad, aireación y tiempo. En particular, el nitrógeno mineralizado en condiciones de anaerobiosis (Nan) es utilizado para conocer cuánto del nitrógeno orgánico es transformado a NH_4^+ (Waring y Bremner, 1964).

El objetivo de aplicar el método de mineralización anaeróbica del nitrógeno (Nan) es conocer de manera eficiente, rápida y económica el nitrógeno que se mineraliza a partir de la materia orgánica lábil. Es decir, aquel nitrógeno aportado por descomposición inmediata de los restos de cultivo y material orgánico incorporados al suelo. El Nan constituye una valiosa información que puede formar parte de modelos de fertilización, de manera tal de ajustar con la mayor exactitud posible las recomendaciones de fertilización nitrogenadas. En este capítulo se describe la metodología aplicada para determinar el nitrógeno mineralizable anaeróbicamente (Nan). Se detallan los pasos en el protocolo que sigue.

5.3. EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

La metodología para determinar el Nitrógeno anaeróbico (Nan) se basa en el método propuesto por Waring y Brenner (1964), modificado por Kenney y Nelson (1982), y se necesita:

- Tamiz de 2 mm.
- Recipientes con tapón hermético, tubos de centrifuga tipo Falcon con pollerita de 100 ml.
- Balanza analítica (precisión).
- Estufa para incubación.
- Agitador oscilatorio.
- Balón de destilación de 100 ml.
- Pipeta automática de 5 y 10 ml.
- Equipo de destilación tipo Kjeldahl.
- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 50 ml.
- Microbureta de titulación con precisión de 0,01 ml.
- Agitador orbital para titulación.
- Centrifuga (3500 rpm).

5.4. REACTIVOS PROANÁLISIS

Los reactivos necesarios son los detallados a continuación:

- Agua destilada
- Cloruro de potasio (ClK)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Solución indicadora de ácido bórico más mezcla de indicadores
- Ácido sulfúrico
- Verde de bromocresol
- Rojo de metilo
- Etanol
- Ácido bórico
- Azul de bromotimol.

5.5. CONDICIONES AMBIENTALES DEL LUGAR DE TRABAJO Y MEDIDAS DE SEGURIDAD DEL PERSONAL DE LABORATORIO

El trabajo de laboratorio debe realizarse con adecuada luz y ventilación, y el proceso de destilación, bajo campana de extracción de gases por el uso de álcalis concentrados como NaOH 10 N.

Se debe usar guardapolvo, guantes, barbijo y bajo la campana, protección para los gases y gafas protectoras.

5.6. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL DE LABORATORIO

El material de laboratorio debe ser lavado con agua destilada o desionizada, además de realizar el calibrado de la estufa a 40 °C.

5.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO PARA EL ANÁLISIS

Una vez la muestra de suelo llega al laboratorio, se seca al aire, colocándola en una bandeja plástica sobre la mesada con ambiente ventilado. Luego, es molida con mortero y pilón de porcelana, y tamizada por malla de 2 mm (tamiz N° 10). Posteriormente, las muestras de suelo, una vez acondicionadas, se colocan en recipientes limpios de plástico o bolsas resistentes.

5.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación, se detallan cada una de las soluciones a preparar.

Cloruro de potasio (ClK) 2 N: disolver 150 g de ClK p.a. en 1000 ml de H₂O destilada (preparar en matraz con aforo).

Cloruro de potasio (ClK) 4 N: disolver 300 g de ClK p.a. en 1000 ml de H₂O destilada (preparar en matraz con aforo). La disolución de los 300 g de ClK se realiza en un vaso de precipitado agregando el agua destilada caliente lentamente y revolviendo continuamente, hasta lograr la disolución total (en aproximadamente 900 ml). Se coloca en un matraz aforado de 1000 ml, se deja enfriar y luego se afora con agua destilada.

Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N: su preparación conlleva una reacción exotérmica, con liberación de vapores irritantes, por lo que debe realizarse bajo campana de extracción de gases. La disolución de los 400 g de NaOH se realiza en un vaso de precipitado agregando no más de 800 ml de agua destilada lentamente y revolviendo de manera continua, hasta lograr la disolución total. Se trasvasa aun matraz aforado de 1000 ml, se deja enfriar y se afora.

Mezcla de indicadores: disolver 0,300 g de verde de bromocresol y 0,165 g de rojo de metilo en 500 ml de etanol (Keeney y Nelson, 1982).

Solución de ácido bórico más indicadores: colocar 40 g de ácido bórico p.a. (H₃BO₃) en un vaso de precipitado de 2 litros y agregar 40 ml de la mezcla de indicadores. Agitar hasta la disolución

completa, medir el pH y ajustar a 5 con el agregado de NaOH 0,01 N. Se trasvasa a un matraz de 2 litros y se afora.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,01 N valorado: para obtener ácido sulfúrico 0,01 N, exactamente valorado, cuyo factor de corrección es incorporado en los cálculos (F_c), se debe previamente preparar las soluciones de biftalato de potasio 0,01 N, hidróxido de sodio 0,01 N y H_2SO_4 0,01 N, para luego valorar esta última.

Solución de biftalato de potasio 0,01 N: pesar 1,02 g de biftalato de potasio ($KHC_8H_4O_4$), PM 204,22 secado en estufa a 103 °C durante 2 o 3 horas. Transferir la sal a un matraz de 500 ml, agregar agua destilada, disolver y llevar a volumen. Mezclar bien.

Solución de hidróxido de sodio 0,01 N: tomar una alícuota de 1 ml de NaOH 10 N y llevar a 1000 ml. Tomar una alícuota de 5 ml en un Erlenmeyer (hacerlo por triplicado) y agregar 30 ml de agua destilada. Titular con biftalato de K 0,01 N preparado en el punto anterior, usando fenolftaleína como indicador, el cual vira de color rosa a transparente.

Cálculo de la normalidad del NaOH

$$NR = \frac{\text{normalidad del biftalato de K} \times \text{vol. gastado de biftalato}}{\text{alícuota del NaOH}}$$

Por ejemplo:

$$NR = \frac{0,01 \text{ N del biftalato} \times 5,186 \text{ ml de biftalato}}{5 \text{ ml NaOH}} = 0,010373 \approx 0,01038$$

$$F_c = \frac{NR}{NT} = \frac{0,01038}{0,01} = 1,03$$

Donde: F_c es el factor de corrección de la normalidad del NaOH, NR es la normalidad real del NaOH y NT es la normalidad teórica del NaOH.

Solución de H_2SO_4 0,01 N: tomar 100 ml de una solución de H_2SO_4 0,1 N y llevar a 1000 ml en un matraz. Tomar una alícuota de 5 ml (hacerlo por triplicado). Agregar 30 ml de agua destilada. Titular con el NaOH 0,01 N estandarizado usando fenolftaleína como indicador (pasa de transparente a rosa).

Cálculo de la normalidad del ácido sulfúrico

$$NR = \frac{\text{normalidad NaOH} \times F_c \times \text{vol. gastado de NaOH}}{\text{Alícuota de } H_2SO_4 \text{ 0,01 N}}$$

Volvemos al ejemplo

$$NR = \frac{0,01 N * 1,03 * 4,85}{5 \text{ ml}} = 0,099 \approx 0,01 N$$

$$F_c = \frac{NR}{NT} = \frac{0,0099}{0,01} = 0,99$$

Donde: F_c es el factor de corrección del ácido H_2SO_4 valorado, NR es la normalidad real u obtenida a partir de la titulación del H_2SO_4 y NT es la normalidad teórica o esperada del H_2SO_4 .

5.9. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE HUMEDAD DEL SUELO

Las muestras de suelo tamizadas son llevadas a estufa a 105 °C hasta peso constante (entre 24 y 48 horas), con esto se saca el contenido de humedad del suelo seco a estufa (H expresado en %) y con ello se obtiene el factor de corrección (F_c), que es utilizado para corregir los valores obtenidos en el análisis. Las fórmulas de H (%) y F_c de la humedad de suelo se presentan en la sección de cálculos (2).

5.10. PROCEDIMIENTO

El procedimiento se divide en tres partes: determinación de nitrógeno inicial del suelo, determinación de nitrógeno incubado y determinación de Nan por diferencia entre el N incubado y el N inicial del suelo.

5.10.1. Determinación de nitrógeno inicial (N inicial)

Para determinar el contenido de $N-NH_4^+$ inicial en las muestras, se pesan 5 g de suelo seco al aire, se agregan 30 ml de CLK 2 N, se agita 1 hora y luego se toma una alícuota que se destila por arrastre de vapor y se cuantifica el $N-NH_4^+$ titulando con un ácido débil.

Pasos a seguir:

a. Obtención del extracto de la muestra:

1. Utilizar una balanza de precisión, pesar 5 g de suelo en un tubo de centrífuga tipo Falcon (con pollerita) de 100 ml, previamente tarado (Figura N° 1).
2. Agregar al suelo 30 ml de CLK 2 N y cerrar el tubo herméticamente.

3. Agitar durante 1 h, ubicando los tubos de manera horizontal (acostados) en un agitador oscilatorio a 125 rpm.
4. Centrifugar durante 6 minutos a 2800 rpm.

De acuerdo a la finalidad del análisis, se puede realizar la extracción de la muestra por duplicado.

b. Destilación del extracto:

1. Preparar el equipamiento para realizar la destilación (destilador por arrastre de vapor, Figura N° 2), se enciende el extractor de gases de la campana, la luz y luego el interruptor del destilador. Se toman todas las medidas necesarias usando una máscara adecuada para tal fin. Se realiza la limpieza del sistema con H_2O destilada (mientras este llega a la temperatura de inicio del análisis), colocando en el balón de destilación 25 ml de agua destilada y haciendo correr esta por todo el sistema. Se recolecta en un Erlenmeyer la destilación y con unas gotas de BTA (Azul de bromotimol) se controla el pH, cuando el color es amarillo (pH ácido), indica que el sistema está limpio.
2. Tomar una alícuota de 10 ml del extracto con una pipeta automática y se introduce en un balón de destilación de 100 ml más 25 ml de H_2O destilada.
3. Luego, previo a introducir el balón en el destilador, agregar 3 ml de NaOH 10 N, a fin de alcalinizar el medio, para lograr que todo el $N-NH_4^+$ sea arrastrado por el vapor de H_2O .
4. Se conecta el matraz al sistema de destilación y se produce el arrastre de todo el NH_4^+ liberado en el proceso.
5. El destilado de la muestra problema se recibe en un Erlenmeyer de 50 ml que contiene una mezcla de 5 ml de ácido bórico más indicadores. Se destila hasta llegar al aforo de 25 ml, donde con las primeras gotas del destilado comienza el cambio de color, virando de borravino a verde brillante. Este paso, la destilación, se realiza por duplicado. Destilar dos blancos. Los mismos se realizan con 10 ml de ClK 2 N más 25 ml de agua destilada, más 3 ml de NaOH 10 N.

c. Titulación del extracto:

1. El extracto de color verde brillante, producto de la destilación recibido en ácido bórico, es titulado con un ácido débil (proceso de tritación). Para la titulación, se emplea una solución de H_2SO_4 0,01 N, exactamente valorada (según se



Figura N° 1. Balanza de precisión.



Figura N° 2. Destilador por arrastre de vapor.

explica en la sección de preparación de reactivos). Esta es colocada en una microbureta (Figura N° 3) y es acompañada por un agitador rotatorio, magnético.

2. Se comienza la titulación colocando el imán en el Erlenmeyer que contiene el extracto, prestando atención al punto final que se observa cuando el color verde vira con una gota a un rosa opaco (Figura N° 4).

5.10.2. Determinación de nitrógeno incubado

Las incubaciones anaeróbicas se realizan colocando 5 g de suelo tamizado por 2 mm en tubos de centrifuga, se agregan 15 ml de H₂O destilada, se tapan herméticamente para mantener la anaerobiosis y se llevan a estufa durante 7 días a 40° C, metodología propuesta por Waring y Brenner (1964). Después del tiempo de incubación, se agregan 15 ml de CLK 4 N, se centrifuga y del sobrenadante se toma una alícuota para realizar una microdestilación por arrastre de vapor (Kenney y Nelson, 1982), obteniendo como resultado el N-NH₄⁺ de incubación. Pasos a seguir:

a. Obtención del extracto de la muestra:

1. Pesar 5 g de suelo en un tubo de centrifuga tipo Falcon (con pollerita) de 100 ml, previamente tarado.
2. Agregar 15 ml de H₂O destilada y tapar con tapón hermético a fin de conservar la anoxia.
3. Incubar en estufa a 40 °C durante 7 días. Sacar los tubos de la estufa.
4. Agregar 15 ml de CLK 4 N y tapar los tubos.
5. Agitar durante 1 hora a 125 rpm (oscilatorio).
6. Centrifugar durante 6 minutos a 2800 rpm.

b. Destilación del extracto:

Para realizar este paso, se siguen las indicaciones descriptas anteriormente en la destilación del extracto obtenido para el N inicial (A.2-).

c. Titulación del extracto:

Para realizar este paso, al igual que anteriormente, se sigue lo indicado en la titulación del extracto para el N inicial del suelo (B. 2-).

Destilar dos blancos. Los mismos se realizan con 10 ml de CLK 2 N más 25 ml de agua destilada, más 3 ml de NaOH 10 N.



Figura N° 3. Bureta semiautomática con agitador magnético.



Figura N° 4. Cambio de coloración al titular el extracto destilado con H₂SO₄ 0,01 N.

5.10.3. Determinación de nitrógeno anaeróbico (Nan)

El Nan se determina por la diferencia entre el N-NH_4^+ producido durante la incubación y la cantidad de N-NH_4^+ inicial del suelo.

5.11. CÁLCULOS

Las fórmulas para calcular el nitrógeno inicial, incubado y anaeróbico son las siguientes:

N inicial y N incubado del suelo. La fórmula empleada para calcular el N inicial y el N incubado del suelo es la siguiente:

$$\% \text{ de N} = \frac{(P - B) * N * Fc_2 \text{H}_2\text{SO}_4 * Vd * 100 * 0,014 * fc}{\text{g de suelo} * \text{alícuota}}$$

Donde: P son los ml de H_2SO_4 gastados en el problema, B son los ml de H_2SO_4 gastados en el blanco, N es la normalidad del ácido, Fc_2 es el ácido sulfúrico (H_2SO_4), factor de corrección del ácido valorado, Vd es el volumen de dilución, 0,014 son los meq del N, Alícuota es la cantidad de extracto del problema destilado y fc, el factor de corrección de humedad de suelo seco a estufa (105°C).

Contenido de humedad de la muestra:

$$\%H = \frac{[(ph - ps)] * 100}{ps}$$

Factor de corrección a partir de la humedad del suelo seco al aire:

$$fc = \frac{100}{100 - H}$$

Donde: fc es el factor de corrección de humedad, H es el porcentaje de humedad de suelo seco al aire, ph es el peso del suelo húmedo y ps, el peso del suelo seco.

Nitrógeno anaeróbico del suelo (Nan). El Nan se calcula por diferencia entre el N-NH_4^+ producido durante la incubación por siete días y la cantidad de N inicial del suelo.

$$\text{Nan} (\%) = \text{N incubado} (\%) - \text{N inicial} (\%)$$

Y multiplicando por 10000, el porcentaje de N mineralizado de forma anaeróbica queda expresado en mg kg^{-1} de suelo.



Figura N° 5. Estufa de incubación.

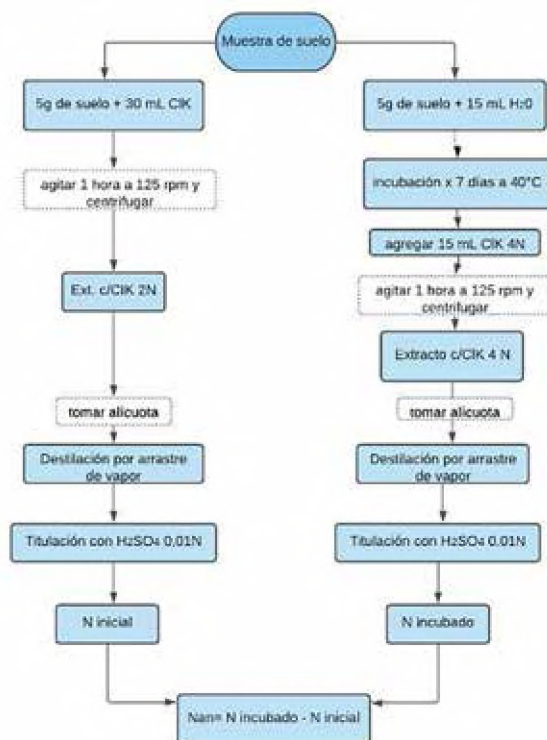


Figura N° 6. Diagrama de flujo para la determinación del nitrógeno anaeróbico (Nan).

Esta metodología es ampliamente utilizada en nuestro país. En las Tablas N° 1 y 2 se muestran valores hallados en distintos trabajos de investigación.

Tabla N° 1. Valores de nitrógeno anaeróbico (Nan) en distintos órdenes de suelos, cultivos y manejos

Prof. (m)	Uso	Rango	Nan mg kg ⁻¹	Orden de suelo
0-0,10	Agrícola-Citrus	53 a 343	89	Oxisol (Misiones) ¹
0-0,10	Agrícola- Labranza Convencional-Maíz		40	Oxisol (Misiones) ²
0-0,10	Agrícola -LC-Té		50	Oxisol (Misiones) ³

0-0,20	Agrícola		≈62	Sur-Este de Pcia. de Bs. As. (diferentes sitios)
0-0,20	Agrícola	12 a 260		Pcia. de Bs. As. (6556 muestras de suelos) ⁵
0-0,05	Experimento 2		≈89	Molisol (Entre Ríos) ⁶
	Agrícola-Soja/ Soja		≈100	
	Agrícola Soja/Maíz		≈98	
	Agrícola Trigo/ Soja			
0-0,05	Experimento 3		≈98	Vertisol (Entre Ríos) ⁷
	Agrícola-Soja/ Soja		≈108	
	Agrícola Soja/Maíz		≈131	
	Agrícola Trigo/ Soja			
0-0,10	Selva subtropical		157	Oxisol (Misiones) ⁸
0-0,10	Forestal-Pinus sp.		47	Oxisol (Misiones) ⁹
0-0,20	Agrícola-Siembra Directa	25 a 99	≈52	Molisol (Buenos Aires) ¹⁰
0-0,10	Forestal-Pinus sp.		30	Inceptisol (Corrientes) ¹¹
	Referencia-Pastizal		100	
0-0,20	Suelos pseudo-prístinos	88 a 141		Suelos (Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa, Entre Ríos y Córdoba) (n=125) ¹²
	Suelos agrícolas	57 a 80		
0-0,05	Forestal-Acacias		426	Molisol (Balcarce, Bs. As.) ¹³
	Pastizal natural		235	
	Agricultura continua		80	
0-0,05	Pseudo-prístino	63 a 334	184	Molisol (Sudeste de Buenos Aires) ¹⁴
	Agrícola continuo	51 a 138	93	
0,05-0,20	Pseudo-prístino	29 a 142	80	Molisol (Sudeste de Buenos Aires) ¹⁵
	Agrícola continuo	25 a 84	52	

¹ Dalurzo, Toledo y Vásquez (2005). ² Toledo *et al.* (2013). ³ Toledo *et al.* (2013).

⁴ Reussi Calvo *et al.* (2013). ⁵ Reussi Calvo *et al.* (2014). ⁶ Gregorutti *et al.* (2014).

⁷ Gregorutti *et al.* (2014). ⁸ Toledo *et al.* (2018). ⁹ Toledo *et al.* (2018). ¹⁰ Martínez *et al.* (2018). ¹¹ Acosta *et al.* (2020). ¹² Rivero *et al.* (2020). ¹³ Rodríguez *et al.* (2015).

¹⁴ García *et al.* (2020). ¹⁵ García *et al.* (2020).

Tabla N° 2. Valores medios de Nitrógeno anaeróbico (Nan) determinados en suelos de la Provincia del Chaco bajo distintos usos

Profundidad	Uso	Nan (mg kg ⁻¹)	Tipo de suelo
0-0,05 m	Referencia-Monte	109	Molisoles
0,05-0,10 m	Referencia-Monte	48	
0-0,05 m	Agrícola-siembra directa	32	
0,05-0,10 m	Agrícola-siembra directa	23	
0-0,05 m	Silvopastoril-Gattonpanic	71	
0,05-0,10 m	Silvopastoril-Gattonpanic	29	
0-0,10 m	Monte	165	Natrustol típico
0,10-0,20 m	Monte	68	
0-0,10 m	Chacra mixta	78	
0,10-0,20 m	Chacra mixta	33	
0-0,10 m	Chacra agrícola	31	
0,10-0,20 m	Chacra agrícola	26	

En resumen. El indicador biológico Nan, resultado de la diferencia entre el nitrógeno inicial y el obtenido luego de una incubación anaeróbica del suelo, es uno de los métodos más utilizados para la determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable. Su importancia se basa en que explica muy bien la mineralización del nitrógeno, siendo un método confiable, rápido y sencillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M.G.L., Toledo, D.M., Contreras Leiva S.M. y Galantini J.A. (2020, octubre 13-16). «Relaciones de estratificación e índices de calidad de suelo en forestaciones con Pinus sp.» [Actas]. *XXVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. «Suelos: Desafíos para una producción y desarrollo sustentables»*. Corrientes, pp. 213-219.
- BENINTENDE, M.C., Benintende, S.M., Sterren, M.A., Musante, C., Saluzzio, M. y De Battista, J.J. (2007). «Modelo para estimar la capacidad de aporte de nitrógeno del suelo». *Agriscientia*, XXIV (2), 97-101.

- CAMPBELL, C.A., Jame, Y.W., Akinremi, O.O. y Cabrera, M.L. (1996). «Adapting the potentially mineralizable N concept for the prediction of fertilizer N requirement». En Ahmad, N. (ed.) *Nitrogen economy in tropical soils*. EE.UU.: Kluwer Academic Publisher.
- CURTIN, D. y Campbell, C. A. (2008). «Mineralizable nitrogen». En Carter, M.R. y Gregorich, E.G. (eds.). *Soil Sampling and Methods of Analysis* (pp. 599-606). Boca Ratón, Florida, EE.UU.: CRC Press.
- DALURZO, H.C., Toledo, D.M. y Vazquez, S. (2005). «Parámetros químicos y biológicos en Oxisoles con uso citrícola». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 23(2), 159-165.
- DOMÍNGUEZ, G.F., García, G.V.M., Studdert, G.A., Agostini, M.A., Tourn, S.N. y Domingo, M.N. (2016). «Is anaerobic mineralizable nitrogen suitable as a soil quality/health indicator?» *Spanish Journal of Soil Science*, 6(2).
- DORAN, J.W. y Parkin, T.B. (1994). «Defining and assessing soil quality». En Doran, J.W. et al. (ed.) *Defining soil quality for a sustainable environment* (pp. 3-21). SSSA Special Publ. 35. Madison, Wisconsin: SSSA and ASA.
- DRINKWATERS, L.E., Cambardella, C.A., Reeder, J. y Rice, C. (1996). «Potentially mineralizable nitrogen as an indicator of biologically active soil nitrogen». En Doran, J.W. y Jones, A.J. (eds.) *Methods for Assessing Soil Quality* (pp. 217-229). Special Publication 49. EE.UU.: Soil Science Society of America.
- ECHEVERRÍA, H.E., San Martín, N. y Bergonzi, R. (2000). «Métodos rápidos de estimación del nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos». *Ciencia del Suelo*, 18, 9-16.
- FABRIZZI, K., Morón, A. y García, F. (2003). «Soil carbon and nitrogen organic fractions in degraded vs. Non-degraded Mollisols in Argentina». *Soil Science Society of American Journal*, 67, 1831-1841.
- FRANZLUEBBERS, A.J. (2016). «Should Soil Testing Services Measure Soil Biological Activity?» *Agricultural & Environmental Letters*, 1(1).
- FRIONI, L. (1999). *Procesos microbianos*. Río Cuarto, Córdoba: Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- GARCÍA, F.O. y Daverede, I. (2007). «Diagnóstico para recomendación de fertilización nitrogenada en cultivos de interés económico». En Yamada, T., Abadía, S. y Vitti, G. (eds.) *Nitrogenio e enxofre na agricultura brasileira* (pp. 277-320). Piracicaba, São Paulo, Brasil: Ipní Brasil.
- GARCÍA, G.V., Wyngaard, N., Reussi Calvo, N.I., San Martino, S., Covacevich, F. y Studdert, G.A. (2020). «Soil survey reveals a positive relationship between aggregate stability and anaerobically mineralizable nitrogen». *Ecological Indicators*, 117. Disponible en <https://bit.ly/3DO811V>

- GIANELLO, C. y Bremner, J.M.A. (1986). «Simple chemical method of assessing potentially available organic nitrogen in soil». *Communication in Soil Science Plant Analysis*, 17, 195-236.
- GREGORUTTI, V.C., Novelli, L.E., Melchiori, R.J.M., Ormaechea, M.V. y Caviglia, O.P. (2014). «Nitrógeno incubado en anaerobiosis y su relación con el nitrógeno orgánico en diferentes fracciones». *Ciencia del Suelo (Argentina)*, 32(1), 41-51.
- GRIFFIN, T.S., Honeycutt, C.W., Albrecht, S.L., Sistani, K.R., Torbet, H.A., Wienhold, B.J., Woodbury, B.L., Hubbard, R.K. y Powell, J.M. (2008). «Nationally-coordinated evaluation of soil nitrogen mineralization rate using a standardized aerobic incubation protocol». *Communication in Soil Science Plant Analysis*, 39, 257-268.
- KEENEY, D.R. y Nelson, D.W. (1982). «Nitrogen-Inorganic Forms». En Page, A.L. (ed.) *Methods of Soil Analysis, Agronomy Monograph 9. Part 2* (2a ed., pp. 643-698). Madison, WI: ASA, SSSA.
- MARTÍNEZ, J.M., Galantini, J.M., Duval, M. y López, F. (2016). «Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable: Una metodología simple y rápida» [Actas]. *XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Ordenamiento Territorial: un desafío para la Ciencia del Suelo*. Río Cuarto, Córdoba.
- MARTÍNEZ, J.M., Duval, M.E., Landriscini, M.R., López, F.M. y Galantini, J.A. (2018). «Balance de nitrógeno para el cálculo de la dosis de fertilizante en trigo». En *Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida* (pp. 122-127). Disponible en: <https://bit.ly/3GBdtHe>
- MARTÍNEZ, J.M. y Galantini, J.A. (2018). «Nitrógeno del suelo: desde la materia orgánica al cultivo». En Galantini, J.A. (ed.) *Siembra directa en el SO Bonaerense* (pp. 7-12). Buenos Aires: autor.
- MARTÍNEZ, J.M., Galantini, J.A. y Duval, M.E. (2018). Contribution of nitrogen mineralization indices, labile organic matter and soil properties in predicting nitrogen mineralization. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(1), 73-89. Disponible en <https://bit.ly/3pYHAlS>
- MEISINGER, J.J. (1984). «Evaluating plant-available nitrogen in soil-crop systems». En Hauck, R.D. (ed.) *Nitrogen in crop production* (pp. 391-441). Madison, Wisconsin: ASA.
- MULVANEY, R.L. (1996). «Nitrogen-Inorganic forms». En Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T. y Sumner, M.E. (eds.) *Methods of Soil Analysis. Chemical Methods* (pp. 1123-1184). Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America. Disponible en <https://bit.ly/3s5Aga6>
- PAGE, A.L., Miller, R.H. y Keeney, D.R. (1982). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America.

- REUSSI-CALVO, N., Sainz-Rozas, H., Echeverría, H. y Berardo, A. (2013). «Contribution of anaerobically incubated nitrogen to the diagnosis of nitrogen status in spring wheat». *Agronomy Journal*, 105, 1-8. Disponible en <https://bit.ly/3llwqcR>
- REUSSI-CALVO, N., Studdert, G.A., Calandroni, M.B., Diovisalvi, N.V., Cabria, F.N. y Berardo, A. (2014). «Nitrógeno incubado en anaerobiosis y carbono orgánico en suelos agrícolas de Buenos Aires». *Ciencia del Suelo*, 33, 189-196.
- RIVERO, C., Wyngaard, N., Crespo, C., Bassi, L., Angelini, H., Larrea, G. y Sainz Rozas, H. (2020). «Cambio en el potencial de mineralización de nitrógeno por la agricultura en la región pampeana» [Actas]. XX-VII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. *Suelos: desafíos para una producción y desarrollo sustentables*. Corrientes, Argentina, pp. 1128-1133.
- RODRÍGUEZ, S., Videla, C. del C., Zamuner, E.C., Picone, L.I., Pose, N.N. y Maceira, N.O. (2015). «Cambios en propiedades químicas de un suelo molisol de la región pampeana argentina con diferente historia de manejo». *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science, ex Agro-Ciencia*, 31(2), 137-148. Disponible en <https://bit.ly/3oNZPKF>
- SOON, Y.K., Haq, A. y Arshad, M.A. (2007). «Sensitivity of Nitrogen Mineralization Indicators to Crop and Soil Management». *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38, 15-16, 2029-2043. Disponible en <https://bit.ly/3dlt8Zo>
- ST. LUCE, M., Whalen, J.K., Ziadi, N. y Zebarth, B.J. (2011). «Nitrogen dynamics and indices to predict soil nitrogen supply in humid temperate soils». *Advance in Agronomy*, 112, 55-102.
- STANFORD, G. y Smith, S.J. (1972). «Nitrogen Mineralization Potentials of soils». *Soil Science Society of American Proceedings*, 36(3), 465-472.
- TOLEDO, D.M., Galantini, J.A., Ferreccio, E., Arzuaga, S., Gimenez, L. y Vazquez, S. (2013). «Indicadores e índices de calidad en suelos rojos bajo sistemas naturales y cultivados». *Revista de la Ciencia del Suelo (Argentina)*, 31(2), 201-212.
- TOLEDO, D.M., Arzuaga, S.A., Galantini, J.A. y Vazquez, S. (2018). «Indicadores e índices biológicos de Calidad de suelo en sistemas forestales». *Ciencia del Suelo*, 36, 1-12.
- WARING, S.A. y Bremner, J.M. (1964). «Ammonium production in soil under waterlogged condition as an index of nitrogen availability». *Nature*, 201, 951-952. Disponible en <https://bit.ly/3GUTe7N>