

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 1. Determinación de nitrógeno en forma de amonio a partir de la actividad microbiana

Marcela R. Cossoli, José M. Recalde, Amalia M. E. Romero,
Amilcar Correa, Daniela González, Mariana Ferreira
y María C. Iglesias

El nitrógeno es un elemento mineral esencial para los organismos vegetales. Dada su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva, es considerado un macronutriente y, después del agua, es el nutriente más importante en el desarrollo de las plantas (Azcón Bieto y Talón, 2013).

El nitrógeno presente en el suelo proviene de la atmósfera, donde se encuentra principalmente como gas dinitrógeno (N_2). Esta molécula, de gran estabilidad debido a su alta energía de enlace, no puede ser aprovechada por la mayoría de los organismos. Ciertos procariotas, llamados diazótrofos, tienen la capacidad de romper este enlace y asimilar el N atmosférico. Esta fijación biológica de nitrógeno es un proceso de reducción en el que el gas dinitrógeno es reducido hasta amonio y rápidamente convertido en cualquier molécula nitrogenada requerida por la célula (Frioni, 2011), pasando a formar parte del nitrógeno orgánico del suelo al ser constituyente de la biomasa microbiana.

En el suelo, el ciclo del nitrógeno representa solamente una parte del ciclo total del nitrógeno en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es de gran importancia para las plantas que absorben nitratos y amonio que utilizan en la síntesis de proteínas y de otros compuestos orgánicos vegetales. Tanto el hombre como los animales aprovechan, en su nutrición, los productos nitrogenados vegetales. Cuando restos animales y vegetales vuelven al suelo, son objeto de numerosos procesos de transformación, en su mayoría de carácter biológico (Fassbender y Bornemisza, 1987).

La mineralización del nitrógeno ocurre fundamentalmente mediante dos procesos: la amonificación, proceso en el que el nitrógeno orgánico es convertido en amonio bajo la acción de un

elevado número de microorganismos heterótrofos, y la nitrificación u oxidación del amonio liberado a nitrato (García Izquierdo *et al.*, 2003).

Del nitrógeno mineralizado en el suelo, con pocas excepciones, el amonio es el principal producto de la reacción y no está confinado a unos pocos grupos de microorganismos, sino que es el típico y característico producto de excreción nitrogenado de la gran mayoría de ellos. Debido a que la liberación de amonio es un fenómeno asociado con muchos organismos fisiológicamente diferentes, el nitrógeno es mineralizado en las condiciones más extremas, tanto de potencial redox como de temperatura y niveles hídricos.

El amonio, por reacciones bioquímicas en el suelo, tiene un destino múltiple: una parte es adsorbida por bases de intercambio y neutraliza los ácidos del suelo, otra parte es inmediatamente reutilizada por múltiples microorganismos heterótrofos, quedando bajo la forma microbiana o fúngica. O bien, si las condiciones son favorables, ser oxidado por los autótrofos a NO_2 y NO_3 y, a veces, según las condiciones de formación y pH (7 o mayor), ser liberado a la atmósfera por volatilización (Coyne, 2000; Frioni, 2011).

El nitrógeno es un nutriente esencial, clave para mantener la fertilidad de los agroecosistemas. Una de sus formas minerales más frecuentes en los suelos es el ión amonio, que puede tener origen a partir de la fijación biológica de los diazótrofos o por amonificación, proceso de mineralización caracterizado por su ubicuidad y amplio rango de organismos intervinientes. Por esta razón, es necesario entender la naturaleza de los procesos que propician la liberación de amonio y los factores que los condicionan, mediante el establecimiento y estandarización de métodos sencillos, de alta sensibilidad y fácilmente repetibles, con el objetivo de obtener un volumen de datos a partir de los cuales generar información consistente.

El método propuesto en este capítulo permite capturar el amonio liberado en muestras de suelo en incubación y cuantificarlo a través de espectrofotometría, mediante la utilización del reactivo de Nessler como agente colorimétrico.

Según la ley de Lambert-Beer (también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer), el aumento de la concentración de una sustancia en solución se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia, dentro de la zona de cumplimiento de la ley (a concentraciones elevadas se pierde linealidad y los datos se vuelven poco fiables).

Como indicador colorimétrico se utiliza el reactivo de Nessler, una sustancia química capaz de detectar pequeñas concentraciones o trazas de nitrógeno amoniacal, es decir, como amonio

o amoníaco. Se torna de coloraciones que oscilan entre amarillo y pardo, en función de la concentración de nitrógeno, con posible formación de precipitados en caso de altas concentraciones (Vogel, 1976). Su rango de detección es de 0,4 a 5 mg.l⁻¹ de nitrógeno amoniacal. La intensidad de la coloración es susceptible de ser cuantificada como absorbancia mediante la utilización de un espectrofotómetro UV-Visible, con longitudes de onda que van desde los 400 hasta los 425 nm.

1.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMONIO A PARTIR DE LA ACTIVIDAD AMONIFICANTE

En el siguiente apartado realizaremos el paso a paso para determinar la producción de amonio a partir de la actividad amonificante.

1.1.1. Fundamento del método

El método está basado en la incubación de muestras de suelo en un sistema cerrado, en condiciones controladas y que propician la actividad microbiana amonificante. El amonio liberado y volatilizado se captura en ácido sulfúrico y posteriormente se cuantifica por espectrofotometría, utilizando el reactivo de Nessler.

1.1.2. Objetivo de la determinación

Detectar y cuantificar el amonio liberado por muestras de suelo, tras un período de incubación, proveniente de la amonificación de fuentes orgánicas de nitrógeno, analizando suelos bajo diferentes prácticas agrícolas.

1.1.3. Equipamiento

Los elementos necesarios son los detallados a continuación:

- Espectrofotómetro UV-Visible Biotraza 722.
- Estufa para incubación.
- Frascos de cierre hermético, de 270 a 300 ml de volumen.
- Bolsitas de polietileno para incubación de 30 micrones de espesor.
- Micropipetas.
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.1.4. Reactivos

Los reactivos necesarios son los siguientes:

- Ácido sulfúrico en concentración 0,02 N. Reacciona con el amoníaco liberado formando sulfato de amonio.

- Reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%). Para la detección del nitrógeno amoniacal capturado por la solución de ácido sulfúrico.

1.1.5. Acondicionamiento del material

Se trabaja con muestras de suelo secas al aire, molidas y tamizadas con malla de 2 mm.

1.1.6. Procedimiento

El procedimiento a llevar a cabo es el detallado a continuación.

1.1.6.1. Confección de la curva de calibración

La curva de calibración permite, a partir de estándares de concentración de amonio conocidos, determinar la concentración desconocida de muestras de diferente origen.

Los estándares se preparan con una solución de sulfato de amonio de 10 milimolar (mM) combinado con agua destilada y reactivo de Nessler en proporción del 10% del total de la solución (Maureira Chicahual, 2013).

Se obtiene la absorbancia de los estándares con el empleo del espectrofotómetro UV-Visible, utilizando un haz de luz monocromático de 400 nm. Con los datos obtenidos, se construye una curva que expresa la absorbancia (variable dependiente) en función de la concentración de amonio en mg.l^{-1} o ppm (variable independiente). Estas variables presentan un elevado coeficiente de determinación (R^2), que indica la alta correlación existente entre ambas (cumpliendo la ley de Lambert-Beer).

Con la ecuación de la línea de tendencia de la curva, se calculan los valores de soluciones de concentración desconocida.

Se preparan tres réplicas de siete estándares de concentración de amonio creciente y conocida, utilizando una solución de sulfato de amonio 10 mM, agua destilada y reactivo de Nessler en proporción del 10% de solución (1 ml de Nessler en 10 ml de solución).

Se realizan lecturas de absorbancia empleando el espectrofotómetro UV-Visible con longitud de onda del haz de luz monocromática de 400 nm.

Se grafican los valores de las tres réplicas y se obtienen tres curvas. Se utiliza como curva de calibración aquella que tiene mayor coeficiente de determinación, es decir, aquella que presenta mayor correlación entre concentración de amonio y absorbancia.

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

	0	1	2	3	4	5	6
Agua (ml)	9,000	8,975	8,950	8,925	8,900	8,875	8,850
Reactivo Nessler (ml)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Solución de sulfato de amonio 10 mM (ml)	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	0,150
Volumen final (ml)	10	10	10	10	10	10	10
Amonio (ppm)	0	0,95	1,9	2,85	3,8	4,75	5,7

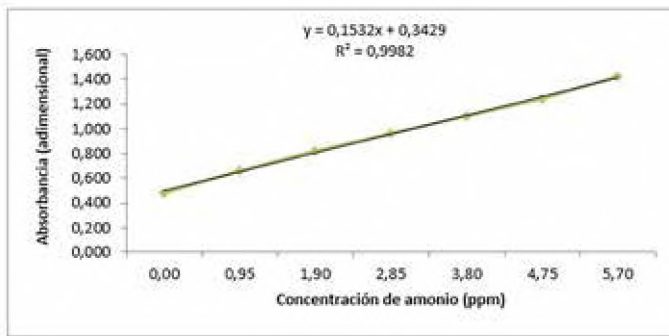


Figura N° 1. Curva de calibración: absorbancia en función de la concentración de amonio. En la parte superior se observa la ecuación correspondiente a la línea de tendencia y el valor de R^2 , que indica una alta correlación entre variables.

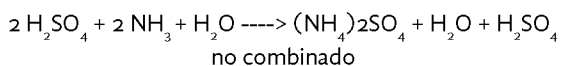
Se obtiene la ecuación de la línea de tendencia de la curva en la que se despeja la variable independiente (x) para obtener la concentración de amonio (ppm):

$$x = (y - a) / b$$

1.1.6.2. Procedimiento con muestras de suelo

Se deben cumplir los siguientes pasos:

- 1) Humedecimiento: se pesan 30 g de suelo y se humedecen de manera homogénea hasta alcanzar aproximadamente un 60% de su capacidad de retención hídrica.
- 2) Dispositivo de incubación: se introduce la muestra humedecida en bolsitas de polietileno de 30 micrones de espesor. Este material es permeable a ciertos gases, como dióxido de carbono o amoníaco, que lo atraviesan por sus poros. En los frascos se cargan 30 ml de ácido sulfúrico 0,02 N. Las bolsitas con las muestras se colocan de manera suspendida dentro de los frascos, evitando que tomen contacto con el ácido en el fondo y sujetándolas en la parte superior con la tapa al cerrar el frasco.
- 3) Incubación: estas cámaras húmedas son llevadas a incubación en estufa a 28 o 30 °C durante 7 días. En tales condiciones de humedad y temperatura se estimula la actividad microbiana (García Izquierdo *et al.*, 2003). A través de la actividad amonificante, se libera amonio al medio que posteriormente se volatiliza por un proceso físico como amoníaco. Este gas atraviesa los poros de la bolsita y es atrapado por la solución de ácido sulfúrico, según la siguiente reacción:



- 4) Lectura de absorbancia: tras la semana de incubación, de cada frasco se extraen 18 ml de la solución y se los combina con 2 ml de reactivo de Nessler, manteniendo así la proporción del 10%. Se procede a la lectura de la absorbancia por triplicado de cada muestra, cargando las alícuotas en cubetas de cuarzo de 3 ml de volumen. Se emplea el espectrofotómetro UV-Visible con una longitud de onda de 400 nm de luz monocromática. Es sumamente importante mantener la limpieza de las paredes de las cubetas, así como enjuagarlas bien entre mediciones con agua destilada, a modo de evitar cualquier tipo obstrucción o error en la medición. También se realiza la lectura de absorbancia de blancos, constituidos por 9 ml de agua destilada y 1 ml de reactivo de Nessler (proporción del 10%). Los datos obtenidos se utilizan para descartar la coloración propia del reactivo de Nessler, no correspondiente a la detección de amonio.

1.1.7. Cálculos

Tras promediar las lecturas de cada muestra, se utiliza la ecuación de la línea de tendencia de la curva de calibración para convertir

los valores de absorbancia en concentración de amonio (ppm). Los resultados se corrigen con el valor obtenido de los blancos.

1.1.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE

1. Ensayo de utilización de abonos orgánicos en producción hortícola¹. Se utilizaron muestras de suelo de un Hapludert típico, provenientes de un ensayo realizado en el marco de un proyecto de investigación en el que participaron la cátedra de Edafología de la FCAYF (UNLP), el Inta La Plata y la cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE. El ensayo se realizó en la localidad de Gorina, partido de La Plata, provincia de Buenos Aires, en un sistema intensivo de producción hortícola bajo cobertura plástica y fertirriego por goteo.

Con la hipótesis de que la enmienda orgánica utilizada habitualmente por los productores del lugar, en general cama de pollo sin previo proceso de compostaje, producía efectos adversos a largo plazo –entiéndase salinización, alcalinización, desbalance de nutrientes– y en búsqueda de alternativas superadoras que permitan mejorar las propiedades del suelo, se realizó el ensayo en cuestión, donde se compararon los siguientes tratamientos:

- T1: sin aplicación de enmiendas.
- T2: agregado de cama de pollo conforme se realiza en la región. Es decir, sin previo compostaje y en dosis aproximada equivalente a 30 o 40 tn/ha que representa en volumen 100 m³/ha.
- T3: agregado de compost de cama de pollo en dosis correspondiente al contenido de materia orgánica del T2.
- T4: agregado de compost de cama de pollo con doble dosis del T3.

Cada tratamiento contó con 4 repeticiones, obteniendo un total de 16 parcelas y se tomaron muestras a 2 profundidades: 0-15 cm (superficie) y 15-30 cm (profundidad). Conforme a lo mencionado, se trabajó con un total de 32 muestras.

Se realizaron los pasos descritos en «Procedimiento» y «Cálculos» para determinar la actividad amonificante de las muestras

1. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto «Evaluación de enmiendas orgánicas sobre el suelo y cultivos hortícolas protegidos», cátedra de Edafología de la FCAYF (UNLP) y cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE.

de suelo bajo los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos se expresan en el Figura N° 2.

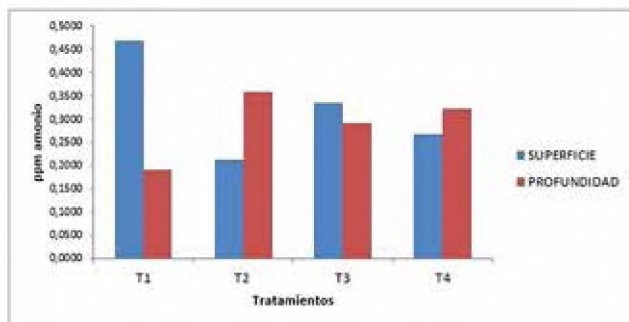


Figura N° 2. Actividad amonificante de los diferentes tratamientos y profundidades, expresada en ppm de amonio.

No se apreciaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre profundidades de muestreo (método de comparación LSD Fisher, con nivel de significación de 0,05).

Sin embargo, es posible percibir las diferencias entre las prácticas a partir de los resultados obtenidos. Si bien el testigo presentó mayor amonificación en superficie, en los tratamientos donde se aplicaron enmiendas orgánicas se manifestó una considerable actividad amonificante hasta los 30 cm de profundidad.

Se sugiere continuar con la investigación presentada, en búsqueda de obtener información y resultados concluyentes sobre los efectos de aplicación de enmiendas orgánicas compostadas.

2. Ensayo de utilización de diferentes compost en un suelo arenoso². Las muestras provinieron de un ensayo que se planteó en la localidad de Santa Ana, provincia de Corrientes, en colaboración con el equipo del Crub-Comahue Bariloche. El ensayo constaba de 14 tratamientos dispuestos en parcelas de 1 m x 1 m cada una que se replicaron en 3 bloques, haciendo un total de 42 parcelas.

Los tratamientos correspondieron a la aplicación de compost de diferentes orígenes: Compost de Biosólidos (Bio), Compost de

2. Los datos aquí presentados se generaron en el marco del proyecto PICT-2008-1027 (ANPCyT), «Aspectos ambientales del uso de compost urbanos y agroindustriales en tres ecoregiones de Argentina», cátedra de Microbiología Agrícola de la FCA-UNNE, Grupo de suelos-Crub-Comahue.

Feedlot (CF), Compost de cama de gallina (CG), Compost de Residuos sólidos urbanos (Rou) y de mezclas de estos, como ser Rou-CF y Rou-CG.

Todas las aplicaciones se realizaron en dosis de 20 y 40 tn.ha⁻¹ y además se incorporó un tratamiento de control (Ctrol) y un tratamiento con fertilización inorgánica (Fi).

Se realizaron cuatro muestreos: diciembre de 2011, junio de 2012, junio de 2013 y diciembre de 2013, en los tres últimos se muestrearon dos profundidades, 0-10 cm y 50-60 cm, mientras que en el primero solo fue de 0-10 cm.

En todas las muestras obtenidas se determinó la producción de ppm de amonio por el método antes descrito, dando los siguientes resultados.

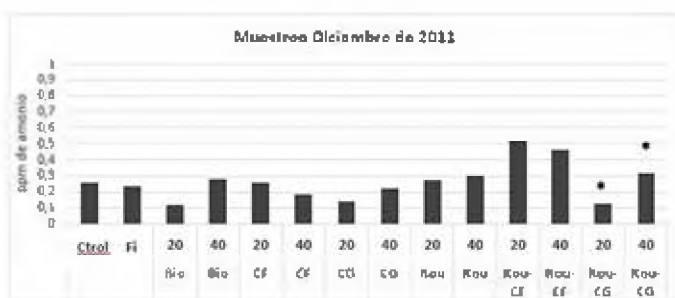


Figura N° 3. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de diciembre de 2011. Los * muestran las diferencias significativas entre esos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).



Figura N° 4. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de junio de 2012. Los * muestran diferencias significativas entre ambas profundidades en dichos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).

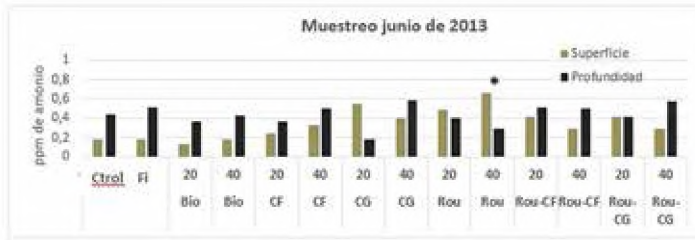


Figura N° 5. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de junio de 2013. Los * muestran diferencias significativas entre ambas profundidades en dichos tratamientos (Anava con Tukey, $p \leq 0,05$).



Figura N° 6. Actividad amonificante expresada en ppm de amonio para los distintos tratamientos del muestreo de diciembre de 2013. No existieron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

Mediante la utilización de Nessler para la cuantificación de amonio, se pudo detectar la producción del mismo en prácticamente todas las muestras analizadas y una producción muy variable con relación a los años de muestreos, a los residuos y dosis utilizadas, así como también con relación a la profundidad de muestreo.

Luego de realizar el análisis de varianza, utilizando el estadístico Tukey, con un nivel de significancia de 0,05, se detectaron diferencias significativas en tres de los cuatro muestreos.

En diciembre de 2011, ambas dosis del tratamiento con mezcla de Rou-CG se diferenciaron significativamente. En junio de 2012 y junio de 2013, las diferencias se encontraron entre las muestras de superficie y profundidad para tres tratamientos en el primero y un tratamiento en el segundo.

1.2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AMONIO A PARTIR DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL N₂

En el siguiente apartado realizaremos el paso a paso para determinar la producción de amonio a partir de la fijación biológica del N₂.

1.2.1. Fundamento del método

A partir de la fijación biológica del nitrógeno, se incorpora N al medio, cuya primera molécula disponible es el amonio (Baca, Soto Urzúa y Pardo Ruiz, 2000).

Se incuba un aislamiento de un microorganismo fijador de nitrógeno en un medio con suelo al 10% (1 g suelo y 10 ml de agua), de acuerdo con Mantilla, Anaya y Zumaqué (2007), y el amonio que libera al medio se puede cuantificar colorimétricamente a partir de la reacción con el reactivo de Nessler que desarrolla una intensidad de color con relación a la cantidad de esta molécula presente en el medio (Maureira Chichual, 2013).

1.2.2. Objetivo de la determinación

Cuantificar el amonio que pueden aportar al medio aislamientos fijadores de nitrógeno atmosférico y que pueda ser aprovechado en el sistema suelo.

1.2.3. Equipamiento

Los elementos necesarios son los detallados a continuación:

- Flujo laminar
- Autoclave
- Espectrofotómetro UV-Visible Biotraza 722
- Shaker
- Micropipetas
- Utillaje de uso normal en laboratorio.

1.2.4. Reactivo

El reactivo necesario es el detallado a continuación:

- Reactivo de Nessler (KI 5%, HgCl 2,5%, KOH 16%) para la detección del nitrógeno amoniacal.

1.2.5. Acondicionamiento del material

Para las incubaciones, se trabaja con suelo y agua debidamente esterilizados. En el caso de los aislamientos a testear, deben estar en activo crecimiento.

1.2.6. Procedimiento

Se deben cumplir los siguientes pasos:

1. **Dispositivos para la incubación.** Se pesa 1 g de suelo, se coloca en un tubo de ensayo y se le adicionan 10 ml de agua. Estos dispositivos se realizan por triplicado para cada aislamiento y también para la situación de referencia que sería un tubo con suelo, sin inoculación, que servirá de referencia para descontar el amonio presente en el sistema.
2. **Siembra de los aislamientos.** Mediante un ansa y bajo flujo laminar se inocula con una pequeña porción del crecimiento de cada aislamiento dentro del tubo con suelo y agua.
3. **Incubación.** Todos los tubos son llevados a incubación a Shaker, a 28 o 29 °C, durante un tiempo de 72 horas con agitación constante a 150 rpm.
4. **Lectura en espectrofotómetro.** Luego del período de incubación, se filtra todo el contenido del tubo, se toman 9 ml de este filtrado y se incorpora 1 ml de reactivo de Nessler (proporción al 10%). Para la lectura en el espectrofotómetro, se procede según indicaciones del fabricante, realizando la calibración del blanco (agua) y la lectura de la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 400 nm. También se incorpora un blanco en la lectura, ya que el Nessler por sí mismo desarrolla cierta coloración que debe ser descontada. Se registran todas las lecturas de absorbancia tanto de los aislamientos como del suelo sin inocular y se utiliza la ecuación de la línea de tendencia de la curva de calibración –procedimiento explicado en la sección anterior– para convertir los valores de absorbancia en concentración de amonio (ppm).

1.2.7. Cálculos

Se obtienen los ppm de amonio, tanto de las muestras como para la referencia, a partir de la fórmula generada en la curva.

$$\text{Fórmula de la curva patrón: } x = y - a/b$$

Luego se obtiene la concentración de amonio en ppm que haya liberado cada aislamiento, realizando la corrección, teniendo en cuenta los blancos de suelo para obtener el valor real de la producción corregida.

Producción de amonio real = ppm del aislamiento – ppm de suelo sin
inocular

1.2.7.1. Resultados obtenidos en la Cátedra de Microbiología
Agrícola de la FCA-UNNE

Producción de amonio por parte de aislamientos de microorganismos rizosféricos. Se trabajó con una serie de aislamientos generados a partir de suelo rizosférico de plantas de algodón. Los mismos crecieron a partir de un medio de cultivo que carecía de nitrógeno, por lo que se asume que son fijadores libres de nitrógeno atmosférico. A partir del método antes mencionado, se cuantificó esa producción de amonio.

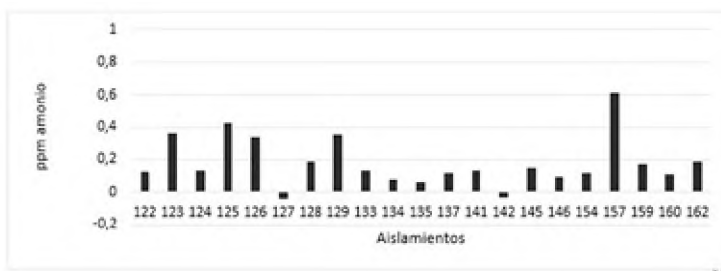


Figura N° 7. Producción de amonio expresada en ppm de amonio para los distintos aislamientos de microorganismos fijadores de nitrógeno.

Los valores que se observan en la Figura N° 7 son corregidos al restar del sistema (suelo inoculado) los blancos de los suelos, por lo tanto, esa producción de amonio se atribuye a los aislamientos, es decir, se pudo cuantificar una producción de amonio a partir del método utilizado en la mayoría de los aislamientos testeados.

En resumen. Aplicando esta técnica fue posible detectar y cuantificar el amonio liberado por muestras de suelo, tras un período de incubación, proveniente tanto de la amonificación de fuentes orgánicas de nitrógeno como a partir de la fijación biológica del nitrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZCÓN BIETO, J. y Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2a ed.) España: McGraw-Hill Interamericana de España.
- BACA, B.E., Soto Urzúa, L. y Pardo Ruiz, M.P. (2000). «Fijación biológica del nitrógeno». *Elementos: Ciencia y Cultura*, 7(38), 43-49.
- COYNE, M. (2000). *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid: Paraninfo.
- FASSBENDER, H. y Bornemisza, E. (1987). *Química de suelos, con énfasis en América Latina*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- FRIONI, L. (2011). *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (1ª ed.) Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora.
- GARCÍA IZQUIERDO, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T. y Trasar-Cepeda, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. España: Mundi-Prensa.
- MANTILLA, C.L., Anaya, M.V. y Zumaqué, L.E.O. (2007). «Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos». *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 6-14. Córdoba, Colombia.
- MAUREIRA CHICAHUAL, J. (2013). *Producción de álcali por actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biofilm dental en niños de 8 años con distinta historia de caries dental*. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Odontología. Disponible en <https://bit.ly/3tuYfzS>
- VOGEL, A. (1976). *Química analítica cuantitativa*. Buenos Aires: Kapelusz.