



ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA LA PRUEBA CUANTITATIVA DEL NMP CON BACTERIAS NITRIFICANTES Y DENITRIFICANTES USANDO COMO MATRIZ COMPOST

STANDARDIZATION OF CONDITIONS FOR QUANTITATIVE TEST MPN WITH NITRIFICANT AND DENITRIFICANT BACTERIA USING COMPOST AS MATRIX

N. Rodríguez-Moreno, C. Toro-Lozano, M. Martínez-Salgado, M. Mercado-Reyes

*Grupo de Microbiología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cr. 7ª # 40-62 Bogotá, Colombia
mmmartin@javeriana.edu.co*

Resumen

Con el fin de estandarizar metodologías que permitan determinar la concentración de bacterias nitrificantes y denitrificantes en compost, se propuso evaluar el crecimiento de estas bacterias en dos concentraciones diferentes del sustrato nitrogenado ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KNO_3), en presencia y ausencia de CaCO_3 . Se utilizó la técnica de número más probable (NMP), revelando los tubos con reactivo de Griess (nitrito), reactivo de Nessler (amonio), y el polvo de zinc (nitrato). Se aplicaron 4 tratamientos para bacterias nitrificantes y denitrificantes respectivamente, trabajando a concentraciones de 0.5 o 0.33 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.5 o 2 g de KNO_3 , evaluados con respecto al mayor crecimiento de biomasa. No se encontraron diferencias significativas en la biomasa de los días 14, 15 y 16 para las bacterias nitrificantes, pero el día con mayor reporte fue el 15 con 115.88 NMP/g de compost, asimismo no se presentaron diferencias significativas que para las bacterias denitrificantes el día 15 y 16 arrojaron el mismo resultado con 31.42 NMP/g de compost. El tratamiento 1 hasta el día 15 (0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con 1 g de CaCO_3 en nitrificantes y 0.5 g de KNO_3 con 5 g de CaCO_3 en denitrificantes) presentó mayor recuperación con recuentos de bacterias nitrificantes y denitrificantes con 112.67 NMP/g de compost y 27.53 NMP/g de compost respectivamente, al día 15. Se demostró que el sustrato nitrogenado, y la adición del carbonato de calcio son importantes para mantener del pH en el medio, promoviendo las reacciones enzimáticas asociadas.

Palabras clave: compost, desnitrificación, nitrificación, número más probable.

Abstract

In order to standardize methodologies that allow to determine the concentration of nitrifying and denitrifying bacteria in compost, bacteria growth was evaluated at two different concentrations of nitrogen substrate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KNO_3), with and without calcium carbonate. Technique used was the most probable number (MPN), revealing the tubes by means Griess reagent (nitrite), Nessler reagent (ammonium), and the zinc powder (nitrate). Four treatments for nitrifying and denitrifying bacteria were applied respectively, with concentrations of 0.5 or 0.33 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.5 or 2g of KNO_3 . Biomass production was evaluated. No significant differences were evidenced in biomass of days 14th, 15th and 16th for nitrifying bacteria; however, 15th day 115.88 MPN/g of compost was obtained for nitrifying bacteria, and 31.42 MPN/g for denitrifying bacteria. Treatment 1 (0.5g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ with 1g of CaCO_3) in nitrifying and 0.5g of KNO_3 with 5g of CaCO_3 in denitrifying group represent the best biomass condition: 112.67 MPN/g and 27.53 MPN/g of compost. 15 days were necessary for incubation because it is the time needed to activate enzymes regulating pH with addition of the CaCO_3 .

Keywords: compost, denitrification, nitrification, most probable number (MPN).

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno, uno de los macronutrientes de mayor importancia en los procesos biológicos, y está presente en diferentes formas en la naturaleza, aunque no todas son asimilables y puede perderse con gran facilidad del sistema (Fauci *et al.*, 1999).

Las bacterias nitrificantes oxidan el NH_3 a formas más asimilables como NO_3 para las plantas, siendo grupos reconocidos oxidantes de amonio como *Nitrosomonas sp.*, y oxidantes de nitrito, *Nitrobacter sp.* Las bacterias denitrificantes evitan las pérdidas de nitrógeno por escorrentía y lixiviación, al reducir formas oxidadas del nitrógeno reintegrándolo al ambiente. Algunas bacterias de este grupo incluyen varias especies de *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus* (Myrold, 2005).

La técnica del número más probable (NMP) se utiliza para observar la densidad poblacional de un grupo determinado de microorganismos de forma indirecta. Girard y Rougieux desde 1964 describieron la metodología NMP para realizar recuento de bacterias nitrificantes y denitrificantes empleando suelo como matriz, con 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como sustrato y adicionando CaCO_3 como estabilizador de pH. En 1991, Verhagen y Laandbroek (1963), realizaron un recuento de bacterias nitrificantes quimiolitotróficas y heterótrofas utilizando una concentración de 2 g de KNO_3 para la misma técnica sin adición de CaCO_3 . Hashimoto *et al.*, en el 2005 modificaron la técnica del NMP de Tiedje 1982, para enumerar bacterias denitrificantes copiótrofas y oligótrofas de la superficie del suelo en la región de Okinawa en el sur de Japón, usando 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Sin embargo en matrices diferentes a suelo, como el caso del compost, no se han reportado estudios con relación a tiempo de incubación, concentraciones de sustrato y requerimiento de CaCO_3 . Siendo el nitrógeno necesario para la descomposición de la materia orgánica por parte de los microorganismos y se estableció como objetivo definir el efecto de la concentración del sustrato nitrogenado, la adición de CaCO_3 y el tiempo de incubación en el crecimiento de bacterias nitrificantes y denitrificantes recolectadas a partir de una pila de compostaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de la investigación

El trabajo realizado fue una investigación de tipo experimental teniendo como factores de diseño: requerimiento de CaCO_3 , concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KNO_3 , y tiempo de incubación. Los tratamientos para bacterias nitrificantes y denitrificantes se presentan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Toma de muestras

El área de estudio está localizada en las pilas de compostaje del cultivo de flores Cultivos del Norte ubicado en el municipio de Tocancipá, departamento de Cundinamarca. De la pila de compost de 13 semanas de maduración se colectaron 10 submuestras con el fin de obtener una muestra compuesta. Este procedimiento se repitió cinco veces siguiendo la metodología de (Pozo *et al.*, 2000). Para la estandarización del tiempo de incubación se recolectaron 11 muestras durante 22 días de modo que se obtuvieron una muestra preliminar y 10 muestras prueba. Para la estandarización de la concentración de sales se recolectaron cinco muestras por un periodo de 15 días.

Variables de estudio

La variable dependiente fue el NMP/g de muestra medido en variables independientes de concentración de sales, requerimiento de CaCO_3 , y tiempo de incubación de las muestras.

Determinación del pH del compost

Se determinó el pH preparando una solución acuosa de 10 g de compost con 25 ml de agua desmineralizada (Benavides, 2004).

Estandarización del tiempo de incubación

Para estandarizar esta variable se tomó únicamente el tratamiento 1 (tablas 1 y 2) para los dos grupos. Cada muestra compuesta fue sembrada en caldo amonio (0.15 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g de CaCO_3 , 1 g de KH_2PO_4 , 0.3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g de NaCl , 0.03 g de FeSO_4 , y 950 ml de agua destilada) por triplicado y en caldo nitrato (2 g de KNO_3 , 5g CaCO_3 , 10 g de glucosa, 50 ml de solución salina y 950 ml de agua destilada) por triplicado y la lectura se realizó los 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 días sugerido por Girard y Rogieux (1964), con el fin de estandarizar

el tiempo de incubación. Dependiendo de los resultados obtenidos se seleccionó el día en el que se encontró mayor número de biomasa para todas las muestras.

Estandarización de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 y CaCO_3

Para la matriz compost, la modificación con respecto a la técnica propuesta por Girard y Rougieux (1964), Verhagen and Laandbroek (1991) y Hashimoto *et al.*, 2005, se centró en la evaluación de dos concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o KNO_3 , y en la adición o no de CaCO_3 sobre la recuperación de la microbiota nitrificante y denitrificante. Se probaron dos medios, amonio (0.5 ó 0.33 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g o sin CaCO_3) y nitrato (2 ó 0.5 g de KNO_3 , 5 g o sin CaCO_3).

Número más probable bacterias nitrificantes y denitrificantes

Se realizaron diluciones seriadas de la muestra hasta 10^{-3} para bacterias nitrificantes y denitrificantes. Luego se sembró 1 ml en 5 tubos con caldo amonio y nitrato respectivamente para cada una de las diluciones y cada uno de estos fueron incubados a 28°C durante dos semanas (Gómez y Nageswara, 1995). Se procedió a calcular el valor de

TABLA 1. Medio amonio con componentes a diferentes concentraciones

Variable	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	CaCO_3 (g)
T1	0.5	1
T2	0.5	0
T3	0.33	1
T4	0.33	0

TABLA 2. Medio nitrato con componentes a diferentes concentraciones

Variable	KNO ₃ (g)	CaCO ₃ (g)
T1	0.5	5
T2	0.5	0
T3	2	5
T4	2	0

NMP a partir de la determinación del número de tubos positivos, en cada dilución para bacterias oxidantes de amonio y reductoras de nitrato, respectivamente. Se adicionaron 2 gotas del reactivo Griess (Valerie y Bardin, 1995) con el fin de realizar la detección de nitritos. Los datos fueron anotados según el número de tubos positivos y negativos por dilución. A los tubos negativos se les adicionó polvo de zinc (Girard y Rougieux, 1964) para detectar la presencia de nitrato en el medio, los que no cambiaron fueron considerados como tubos negativos a los cuales se les adicionó reactivo de Nessler (Mariorri *et al.*, 1982), y así se confirmó la presencia de amonio y nitrato indicativo de que no ocurrió proceso de nitrificación y desnitrificación respectivamente. Luego se realizó el recuento por medio de las tablas de Cochran (1950), con el ajuste respectivo de las diluciones tomadas para leer (Schmidt y Belser 1982; Verhagen y Laandbroek 1991; Deni y Penninckx 1999).

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de Shapiro Wilk, y de Kruskal Wallis con un $\alpha=0.05$ a las tres variables de estudio: tiempo, sustrato nitrogenado y CaCO₃ (Sokal y Rohlf

2000), por medio del *software* estadístico Statistix 8.1.

Resultados y discusión

Las muestras de compost de flores recolectadas en Cultivos del Norte, para la prueba de estandarización del tiempo de incubación del NMP de bacterias nitrificantes y denitrificantes presentaron un promedio de temperatura de 21°C con un rango mínimo de 19°C y máximo de 24°C y pH entre 7.89 y 8.54.

La importancia que tiene el período de incubación de muestras (Belser, 1977) en general para todos los procesos y en este caso para los relacionados con el nitrógeno, fue la razón por la cual se tomaron 11 muestras para la estandarización del tiempo y cinco para la estandarización de las sales, ya que con el seguimiento realizado durante siete días fue posible reconocer la fluctuación de los valores de NMP/g.

Se tomó compost de 13 semanas de madurez, debido a que es suficientemente estable por baja emisión de CO₂ y alta mineralización (Costa *et al.* 1991) para ser usado con propósitos agrícolas sin ningún riesgo para la cosecha.

Se decidió estandarizar el tiempo para bacterias nitrificantes y denitrificantes con el T1 (0.5 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ con 1 g de CaCO_3 y 0.5 g de KNO_3 con 5 g de CaCO_3 respectivamente), debido a que en el único estudio que se ha aplicado NMP para bacterias nitrificantes y denitrificantes según Kowalchuk *et al.*, 1999, fue en compost procedente de desechos animales en donde utilizaron las concentraciones usadas por Verhagen y Laanbroek, 1991.

Con el fin de establecer el mejor día para hacer la lectura después de la incubación, obteniendo mayor biomasa en caldo amonio, se calcularon las medias para cada una de las muestras registrando el mayor crecimiento el día 15 (figura 1). Dichos datos no se distribuyeron normalmente según la prueba de Shapiro Wilk, por tanto se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con un $\alpha=0,05$, obteniendo un $p < 0,00001$, con lo que se demostró nuevamente que el mayor índice de crecimiento fue del día 15.

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre la concentración de bacterias de los días 14, 15 y 16, la concentra-

ción máxima de bacterias nitrificantes se obtuvo el día 15, con biomasa de 143 NMP/g de compost, mientras la más baja fue de 70 NMP/g de compost (figura 2). Las diferencias que se encontraron entre las muestras se debieron a la alta variabilidad de la tabla del NMP ya que sus valores oscilan determinadamente dependiendo del número de tubos positivos, sin tener en cuenta la similitud de los resultados cualitativos arrojados.

Verhagen y Laanbroek 1991, indican que 15 días es el tiempo suficiente para que las bacterias amonio-oxidadoras pasen el amonio a nitrito, en condiciones óptimas, lo que sugiere que se gastaría un mes para evidenciar la presencia de bacterias nitrito oxidadoras, ya que en los últimos 15 días de incubación ocurriría el paso de nitrito a nitrato, si se parte de caldo amonio como sustrato. Según Yuan *et al.*, 2005 y Degrange y Bardin, 1995, el color de los tubos persiste luego de un mes de incubación a 28°C. Con este fenómeno se sugiere que el NO_2 puede coexistir con el NO_3 en el medio amonio del NMP y los reactivos no diferencian entre NO_3 y NO_2 . Belser y

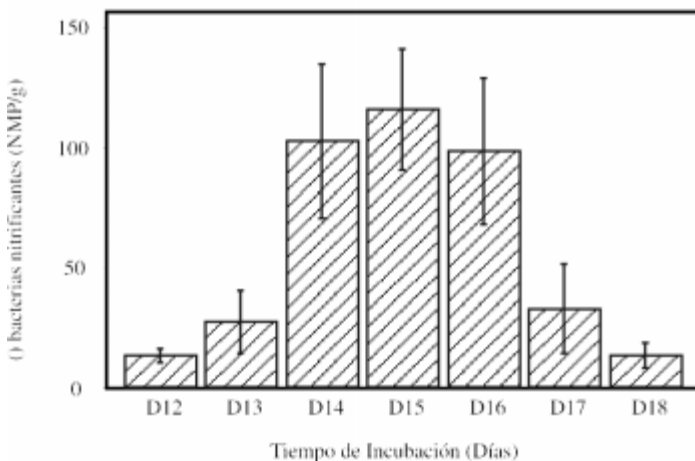


FIGURA 1. Registro diario de las medias del NMP/g de bacterias nitrificantes con desviación estándar

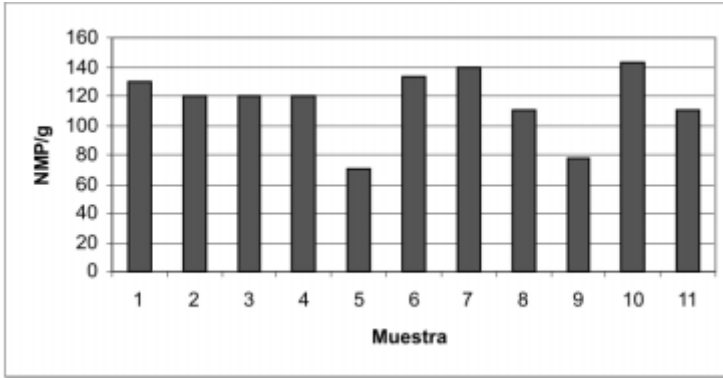


FIGURA 2. Registro de las medias del NMP/g de bacterias nitrificantes el día 15 de las muestras recolectadas para la estandarización del tiempo de incubación

Schmidt, 1978, afirman que el NMP es un acercamiento tradicional a estudiar la dinámica de población de nitrificantes en suelo, y por tanto esta técnica debe leerse cuando se observe la mayor cantidad de tubos positivos, ya que por razones fisicoquímicas, las poblaciones desaparecen a menudo con la incubación.

Por tanto cabe la posibilidad de que pasados 15 días de incubación con nitrito o nitrato formado puede suceder desnitrificación incompleta que podría formar óxido nitroso que se va a perder, por la cual los resultados de biomasa del día 16 en adelante resultaron menores, al reaccionar dichos compuestos con el reactivo de Griess (Valerie y Bardin, 1995) o el polvo de zinc. También puede que se haya dado el ciclo completo del nitrógeno en algunos micrositios por presencia de bacterias capaces de reducir en bajas condiciones de oxígeno, llevando NO_3 a N_2 (Cadrin, 1997), o por último realice una reducción desasimilatoria que lleve el nitrito o nitrato formado a amonio nuevamente, razón por la cual los tubos dieron resultados negativos a la reacción con el reactivo de Nessler.

Con el fin de establecer el día de incubación en que se obtuvo mayor biomasa de

bacterias denitrificantes en caldo nitrato del NMP, se calcularon las medias para cada una de las muestras registrando el mayor crecimiento los días 15 y 16 (figura 3). Dichos datos no se distribuyeron normalmente según la prueba de Shapiro Wilk por tanto se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con un $\alpha=0.05$, obteniendo un $p < 0.00001$, con lo que se demostró nuevamente que el mayor índice de crecimiento se evidenció los días 15 y 16. Con la lectura del NMP para bacterias denitrificantes se obtuvo una concentración máxima de 39 NMP/g de compost, a partir de la muestra 4, mientras que la mínima fue 23.3 NMP/g de compost obtenido de la muestra 3 (figura 4).

Aunque Belser 1977, indica que los experimentos con bacterias denitrificantes requieren tres semanas como tiempo de incubación, en el presente estudio se evidenció que luego del aumento inicial de biomasa seguido de una estabilización el número de individuos disminuye en función del tiempo.

En cuanto a la utilización del nitrato como fuente de nitrógeno Samuelsson y Gustafsson 1988, describen mayor la acumulación de óxido nitroso en la siembra con caldo nitrito comparada con la produc-

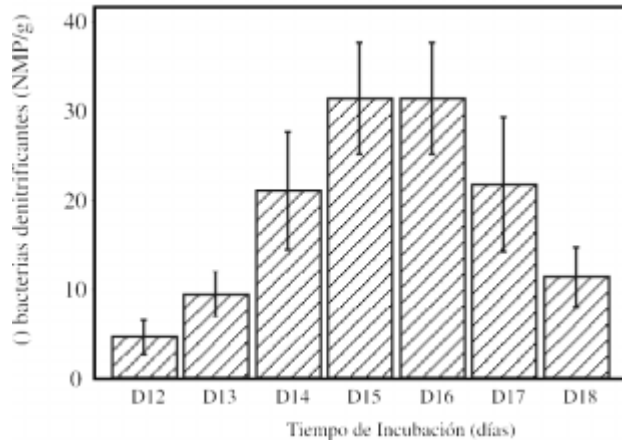


FIGURA 3. Registro diario de las medias del NMP/g de bacterias de denitrificantes con desviación estándar

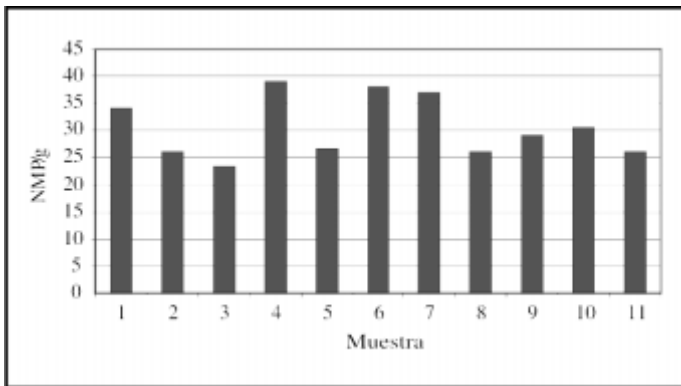


FIGURA 4. Registro del NMP/g de bacterias denitrificantes de las muestras recolectadas para la estandarización del tiempo de incubación

ción en medio con nitrato, posiblemente por la reducción del nitrito, en respuesta a la toxicidad del mismo (Kaspar, 1982).

Adicionalmente Samuelsson 1985, encontró que la desnitrificación puede llevarse a cabo en caldo con medio nutritivo a las 12 horas de incubación, de modo que la reacción con el polvo de zinc pudo haberse inactivado después del período de almacenamiento; por tanto, algunos de los tubos pudieron haber arrojado resultados

falsos negativos; este factor fue controlado con la observación diaria de la capacidad de reducir nitrato a nitrito (Valerie y Bardin, 1995).

Letey *et al.*, 1980, indicaron que la enzima nitrato reductasa desasimilatoria tiene la capacidad de desarrollarse rápidamente, mientras que la enzima óxido nitroso reductasa desasimilatoria se desarrolla lentamente luego del inicio de las condiciones anóxicas.

La mayor biomasa en caldo amonio para bacterias nitrificantes se obtuvo en T1, con 112 NMP/g de compost (figura 5), mientras que T4 presentó la menor biomasa. Con estos resultados se aplicó la prueba de Shapiro Wilk y Kruskal-Wallis con un $\alpha=0,05$ obteniendo un $p < 0,00001$, demostrando diferencias significativas entre T1 y los demás tratamientos.

Según White *et al.*, 1977, un medio de cultivo de bacterias nitrificantes, así como en el suelo, necesita roca fosfórica, NaHCO_3 o CaCO_3 , con el fin de que evitar un proceso lento o inhibición del mismo ocurrido por la acidificación producto de la formación de ácido nítrico en caldo amonio. Enzimas como la amonio monooxigenasa (AMO), la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), y la nitrito oxidoreductasa (NOR) pierden actividad a pH por debajo de 6. Según Juliette *et al.*, (1993), la AMO más que la HAO se inhibe a pH menor de 4.5 y mayor de 11, resultados que se evidenciaron en T2 y T4, donde la reacción con Griess y polvo de zinc fue negativa cuando el medio no tenía CaCO_3 .

El proceso de la nitrificación en su mayoría se presenta por la acción de bacterias autotróficas, aunque las bacterias heterotróficas, muchas veces hacen parte este proceso. El resultado es la inhibición de la nitrificación por causa de la producción de glucosa o compuestos orgánicos a partir de estas bacterias (Verhagen *et al.*, 1993). Asimismo, según Verhagen y Laanbroek 1991, la ausencia o bajos rangos en la formación de nitrato se asocian con la supresión del proceso de nitrificación por más bacterias heterótrofas competitivas. Estas bacterias inmovilizan el nitrógeno mineral existente, por lo cual el crecimiento de las bacterias en el tratamiento con 0,33 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue menor ya que al haber competencia por el sustrato se consumió mucho más rápido el amonio presente, definiendo mayor crecimiento en T1.

Tortoso y Hutchinson 1990, Anderson y Levine, 1986 y Goreau *et al.*, 1980, indican por ejemplo, que *Nitrosomonas europaea* tiene la capacidad de producir NO y N_2O proveniente de amonio e

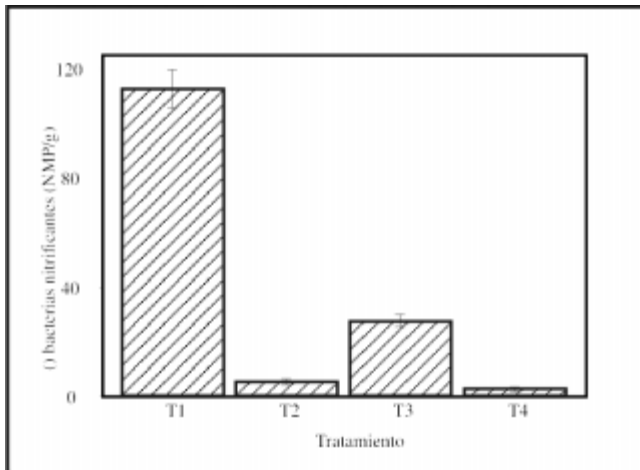


FIGURA 5. Registro de las medias por tratamiento del NMP/g de bacterias nitrificantes con desviación estándar

hidroxilamina, por tanto el nitrógeno se estaría perdiendo sin comenzar un proceso de nitrificación, y en el caso del T3 sería más rápida la pérdida al tener menor cantidad de amonio en el medio.

En la estandarización de dos concentraciones de KNO_3 y la adición de CaCO_3 sobre la recuperación de biomasa, actividad y contribución del mayor recuento de bacterias denitrificantes por la técnica del NMP fueron calculadas las medias para cada una de las muestras. T1 presentó mayor recuento con 27,5 NMP/g de compost con diferencias significativas frente a los demás tratamientos (figura 6).

Smith *et al.*, 1982, demostraron que con la baja concentración de glucosa y nitrato el producto predominante es nitrito evidenciándose amonio. Igualmente Samuelsson 1985, plantea que cuando *Pseudomonas putrefaciens* fue cultivado anaeróbicamente con glucosa como fuente de carbono y nitrato como aceptor de electrones, el consumo de nitrato y la producción de nitrito presentan el mismo patrón reportado para *Citrobacter* sp. reduciendo el nitrito a amonio tan pronto como el nitrato se pre-

sentó en el medio. Según Smith *et al.*, 1982, esta acumulación de nitrito puede tener efectos tóxicos representados en la inhibición en el sistema de reducción enzimático. No obstante algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de reducir nitrato con acumulación de nitrito en el medio (Samuelsson, 1985). Es de aclarar que los niveles de nitrito acumulado dependen de la concentración inicial de nitrato en el medio, ya que Blaszczyk *et al.*, 1985, afirma que en altas concentraciones de NO_3 la cantidad de nitrito acumulado podría llegar a ser casi 1 g de N por litro de medio y que definitivamente la acumulación de nitrito durante la reducción de nitrato depende del equilibrio apropiado y no apropiado de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Por otra parte, es posible que con la adición de CaCO_3 haya sido posible la regulación del pH del medio nitrato de modo que se facilitó la recuperación de bacterias denitrificantes. McKeeney, 1985, encontró que en suelo que las condiciones suavemente ácidas pueden llegar a inducir autodescomposición de ácido nitroso, constituyendo uno de los principales mecanis-

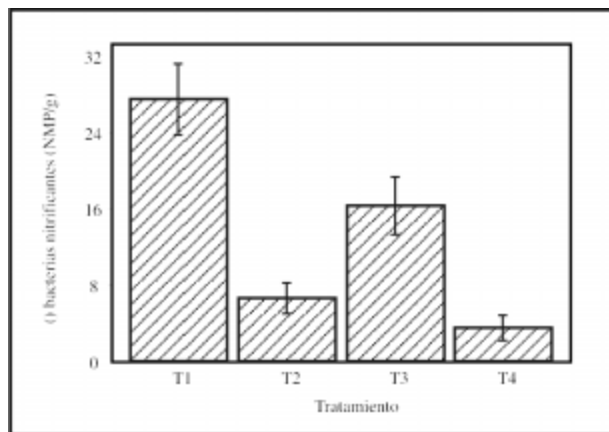


FIGURA 6. Registro de las medias por tratamiento del NMP/g de bacterias denitrificantes con desviación estándar

mos de pérdida de nitrito (Van Cleemput *et al.*, 1976). Del mismo modo la descomposición de HNO_2 es dependiente de pH y es más significativa con un pH menor a 5 (Smith y Chalk 1980).

Asimismo, la adición de cobre en la solución de oligoelementos presente en el caldo nitrato, pudo haber estimulado la enzima oxido nitroso reductasa compensando así, la sensibilidad del dicha enzima por el oxígeno. Es importante destacar que es posible que numerosas especies bacterianas puedan llevar a cabo procesos de denitrificación en medios de cultivo pero este hecho no asegura que el organismo sea capaz de hacer lo mismo en suelo u otro sustrato (Nash y Bollag, 1974). Beijerinck *et al.* 1970, encontraron que algunos organismos denitrificantes en el suelo, como *Bacillus sp.* al ser incubado con nitrato no favorecía el proceso de desnitrificación.

CONCLUSIONES

La técnica del número más probable para bacterias nitrificantes y denitrificantes en compost, se estandarizó con una concentración de sustrato nitrogenado de 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con 1 g de CaCO_3 en nitrificantes y 0.5 g de KNO_3 con 5 g de CaCO_3 en denitrificantes presentando mayor recuperación con recuentos de bacterias nitrificantes y denitrificantes con 112.67 NMP/g de compost y 27.53 NMP/g de compost respectivamente, al día 15.

Se demostró la importancia del CaCO_3 en el medio, como buffer para mantener el pH debido a que la carencia de este puede disminuir las reacciones enzimáticas y por ende la biomasa producida.

Se pudo evidenciar la presencia de bacterias denitrificantes en un proceso de compost aeróbico, lo cual demuestra la microaerofilia o anaerobiosis que se pro-

duce en ciertas etapas. También se evidenció la gran cantidad de bacterias nitrificantes presentes, lo que es muy bueno para los procesos agrícolas, al ser usado el compost como un insumo asegura de cierto modo el ciclaje de nitrógeno en el suelo.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, I. y LEVINE, J., Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, (51), 938-45.
- BEIJERINCK, M. y MINKMAN, D., 1909. Bildung und Verbrauch von Stickstoffoxydul durch Bakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr., Hyg: Abt.*, 1909, 2 (25), 30-63.
- BELL, L. y FERGUSON, S., Nitric and nitrous oxide reductases are active under aerobic conditions in cells of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochemical Journal*, 1991, (273), 423-7.
- BELSER, L., Nitrate reduction to nitrite, a possible source of nitrite for growth of nitrite-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, (34), 403-10.
- BELSER, L. y SCHMIDT, E. Diversity in the Ammonia-Oxidizing Nitrifier Population of a Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, (36), 584-8.
- BETLACH, M. y TIEDJE, J., Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, 1981, (42), 1074-84.
- BLASZCZYK, M., GALKA, E., SAKOWICZ, E. y MYCIELSKI, R. Denitrification

- of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. III. Methanol. *Acta Microbiology Pol.*, 1985, (34), 195-206.
- BENAVIDES, E. *Laboratorio de bioquímicas: manual de practicas*, Universidad de San Buenaventura, Cartagena, Colombia, 2004, 155.
- CADRIN, F. *Effets du travail du soin, des systèmes de culture (Monoculture etrotatuon) et du niveau de fertilisation azotee sur les émissions d'oxyde Nitreux*. *Departament des sciences des ressources naturelles*, Université McGU, Montreal, 1997, 78.
- COCHRAN, W. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number." *Biometrics*, 1950, (6), 105-6.
- COSTA, F., GARCÍA, C., HERNÁNDEZ, T. y POLO, A. *Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización*. Consejo Superior de Investigaciones científicas (ed.). Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Murcia, España, 1991.
- DEGRANGE, V. y BARDIN, R. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, (61), 2093-8.
- DENI, J. y PENNINGCKX, M. Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, (65), 4008-13.
- FAUCI, M., BEZDICEK, D., CALDWELL, D. y FINCH, R. End-product Quality and Agronomic Performance of Compost. *Compost Science and Utilization*, 1999, (1), 2.
- GIRARD, H. y ROUGIEUX, R. *Técnicas de microbiología agrícola*, Acribia, Zaragoza, España, 1964, 267.
- GÓMEZ, Y. y NAGESWARA, L. *Efecto de A. hypogaea (Papilloniaceae) y la alcalinidad del suelo sobre bacterias asociadas con nitrógeno y ureasa*, Universidad de Venezuela, 1995, 145.
- GOREAU, T., KAPLAN, W., WOFYSY, S., MCELROY, M., VALOIS, M. y WATSON, S. Production of NO₂- and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Applied Environmental Microbiology*, 1980, (40), 526-32.
- HASHIMOT, T., SOOK, W. y NAGAOKA, K. A quantitative evaluation and phylogenetic characterization of oligotrophic denitrifying bacteria harbored in subsurface upland soil using improved culture. *Biology Fertility Soils*, 2005, (42), 179-85.
- JULIETTE, L., HYMAN, M. y ARP, D. Inhibition of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas europaea* by Sulfur Compounds: Thioethers are Oxidized to Sulfoxides by Ammonia Monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, (59), 3718-27.
- KASPAR, H. Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: detoxication mechanism. *Archives of Microbiology*, 1982, (133), 126-30.
- KOMADA, T., SHIMADA, K. y MORI, T. Studies on anaerobic biphasic growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzen*. *Plant Cell Physiology*, 1969, (88), 855-65.
- KOWALCHUK, G., NAOUMENKO, Z., DERIKX, P., FELSKE, A., STEPHEN, J. y IRINA, A. Molecular Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the *â*

- Subdivision of the Class *Proteobacteria* in Compost and Composted Materials. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, (65), 396-403.
- LETEY, J., HADAS, A., VALORAS, N. y FOCHT, D. Effect of preincubation treatments on the ratio of N_2O/N_2 evolution. *Journal Environmental Quality*, 1980, (9), 232-5.
- MARIORRI, A., MARIORRI, F., CHAMPIGNY, M., AMARGER, N. y MOYSE, A. Nitrogen Isotope Fractionation Associated with Nitrate Reductase Activity and Uptake of NO_3^- by Pearl Millet. *Plant Physiology*, 1982, (69), 880-4.
- McKENNEY, D., SHUTRLEWORTH K., VRIESACKER J. y FINDLAY W. Production and Loss of Nitric Oxide from Denitrification in Anaerobic Brookston Clay. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, (43), 534-41.
- MYROLD, D. Transformations of nitrogen in Sylvia, D., Hartel, P., Fuhrmann, J. and Zuberer, D. *Principles and Applications of Soil Microbiology*, Prentice Hall, New Jersey, USA, 2005, 333-72.
- NASH, C. y BOLLAG, J. Comparative Denitrification of Selected Microorganisms in a Culture Medium and in Autoclaved Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1974, 27(4), 674-7.
- PAYNE, W. y RILEY, P. Suppression by nitrate of enzymatic reduction of nitric oxide. *Procarriotes Society Exp. Biology Medical*, (132), 258-60.
- POZO, R., DIEZ, V. y BELTRÁN, S. Anaerobic pre-treatment of slaughterhouse wastewater using fixed-film reactors. *Bioresource Technology*, 2000, (71), 143-9,
- REVSBECH, N., NIELSEN, L., CHRISTENSEN, P. y SORENSEN, J. Combined oxygen and nitrous oxide microsensors for denitrification studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, (54), 2245-9.
- SAMUELSSON, M. Dissimilatory Nitrate Reduction to Nitrite, Nitrous Oxide, and Ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, (50), 812-5.
- SAMUELSSON, M. y GUSTAFSSON, L. Heat Production by the Denitrifying Bacterium *Pseudomonas fluorescens* and the Dissimilatory Ammonium-Producing Bacterium. *Pseudomonas putrefaciens* during Anaerobic Growth with Nitrate as the Electron Acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, (54), 2220-5.
- SCHMIDT, M. y BELSER, J. Dissimilatory reduction of NO_2^- to NH_4^+ and N_2O by a soil *Citrobacter sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, (43), 854-60.
- SMITH, C. y CHALK, P. Fixation and loss of nitrogen during transformations of nitrite in soils. *Soil Science Society American Journal*, 1980, (44), 288-291.
- SOKAL, R. y ROHLF, J. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*, 3ª edición, W.H. Freeman, New York, 2000, 887.
- TIEDJE, J. Denitrifiers. In Weaver R., Angle J. and Bottomley P. (eds.), *Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America Book Series*, n° 5, Madison, Wisconsin, 1982, 245-67.

- TORTOSO, A. y HUTCHINSON, G. Contributions of Autotrophic and Heterotrophic Nitrifiers to Soil NO and N₂O Emissionst. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56, 1799-1805.
- VALERIE, D. y BARDIN, R. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(6), 2093-8.
- VAN CLEEMPUT, PATRICK y MCLLHENNY. Nitrite decomposition in flooded soil under different pH and redox potential conditions. *Soil Science Society American Journal*, 1976, (40), 55-60.
- VERHAGEN y LAANBROEK. Competition for limiting amounts of ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57, 3255-63.
- VERHAGEN, DUITS y LAANBROEK. Effects of Grazing by Flagellates on Competition for Ammonium between Nitrifying and Heterotrophic Bacteria in Soil Columns. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59, 2099-2106.
- WHITE, SCHEWERT, ONDRAKO y MORGAN. Factors Affecting Nitrification In Situ in a Heated Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, 33, 918-25.
- WILLIAMS, ROMERO, y EAGON. Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*: some parameters of growth and active transport. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978 (36), 257-63.
- YUAN, RAN, SHEN y WANG. Characterization of nitrifying bacteria communities of soils from different ecological regions of China by molecular and conventional methods. *Biology Fertility Soils*, 2005, (41), 22-7.
- ZIBILSKE. Composting of Organic Wastes in Sylvia, D., Hartel, P., Fuhrmann, J. and Zuberer, D. *Principles and Applications of Soil Microbiology*, Prentice Hall, New Jersey, USA, 2005, 587-605.

Recibido: 29-01-2007

Aprobado: 30-08-2007