ASPECTOS METODOLOGICOS DE LA ESTIMA DE LA DESNITRIFICACION POTENCIAL EN SEDIMENTOS DE ARROZALES.

V.N.Astorga, E.Novella, F.A.Comín y E.Forés.

Departamento de Ecología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avgda. Diagonal 645. 08028 Barcelona.

Palabras clave: Desnitrificación, reducción de nitratos, acetileno.

ABSTRACT

Methodological aspects of potential denitrification were studied in the laboratory, with sediments collected in the Ebro River Delta (N.E.Spain).

Sediments with NO_3^- (16mM) and glucose (2.5 mM) were incubated anaerobically, and NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ y N_2O concentrations were monitored after each incubation period. N_2O gas samples were analyzed with an ECD gas chromatograph.

We studied the preservation of gas samples in Vacutainer vacuum tubes at different temperatures and compared samples analyzed directly from the incubation flasks with samples stored in Vacutainer vacuum tubes. NO_3^- reduction was compared with denitrification measured with the acetylene blocking technique.

Results recommend the use of Vacutainer when the number of samples is high and when studying denitrification in-situ, otherwise is best to analyze samples directly from the incubation flasks. NO_3^- reduction and denitrification give more information studied together than when studied separately.

INTRODUCCION

La desnitrificación es un proceso por el cual los óxidos de nitrógeno (NO_3^- , NO_2^-) son reducidos a N_2O y N_2 a través de una cadena de reacciones. Este proceso lo realizan mayormente bacterias anaeróbicas facultativas que utilizan nitrato o nitrito como sustrato respiratorio cuando el oxígeno del medio es limitante (Knowles, 1981; Sprent, 1987; Stolp, 1988; Seitzinger, 1988). La reducción disimilatoria o amonificación de nitrato es otro proceso bacteriano de reducción de óxidos de nitrógeno en suelos y sedimentos, sin embargo su producto final, amonio, no implica una pérdida de nitrógeno del sistema. Ambos procesos ocurren simultáneamente aunque a diferentes tasas en suelos y sedimentos de distintas características. (Tiedje et al., 1982; Koike & Sorensen, 1988).

En los últimos 20 años se han desarrollado mucho las técnicas de medida de ambos procesos. Revisiones amplias de las metodologías utilizadas son la de Tiedje et al. (1989) y la de Seitzinger (1988).

En este artículo tratamos detalles de la metodología utilizada para la medida de la desnitrificación potencial con la técnica de inhibición del enzima N_2O -reductasa con acetileno. Las principales ventajas de este método son: (1) la determinación de la desnitrificación es rápida, de elevada sensibilidad y económica; (2) la perturbación del sedimento es mínima y se pueden conservar perfiles de NO_3^- similares a los encontrados in-situ, si los tiempos de incubación son cortos; (3) en algunos sedimentos se pueden determinar simultáneamente la reducción de nitratos total y la desnitrificación. Sus desventajas son: (1) a concentraciones de NO_3^- muy bajas la inhibición por acetileno de la reducción del N_2O puede ser incompleta; (2) el inhibidor

puede afectar otros procesos en el sedimento que son importantes para la reducción del nitrato [nitrificación]. (Koike & Sorensen, 1988). Al final de este artículo se compara la medida de la desnitrificación mediante esta técnica con la estima de la desnitrificación por desaparición de nitratos (reducción de nitratos total).

MATERIAL Y METODOS.

Para la conservación de muestras de gases se necesitan recipientes estancos y con un volumen determinado de vacío (el volumen de la muestra de gas). Los tubos estériles de análisis de sangre Vacutainer (Beckton & Dickinson) cumplen estas características. Aquí presentamos pruebas para comprobar la adecuación de estos tubos a la conservación de muestras de gases producidos por la desnitrificación.

Medida de los contaminantes en los Vacutainer.

Se inyectaron 6 ml. de helio en 9 tubos Vacutainer de 5 ml. (volumen de vacío, volumen real 5.5 ml.). Se analizaron muestras de estos 9 tubos en un cromatógrafo de gases, identificando y cuantificando los diferentes picos que aparecían en los cromatogramas resultantes (He, O₂, CO₂, N₂O, C₂H₂, vapor de agua).

Efecto del Vacutainer en la conservación de las muestras.

Se compararon medidas de N₂O de muestras inyectadas en el cromatógrafo directamente (patrón de 51 ppmv), con muestras de patrón que habían sido inyectadas previamente en 9 tubos Vacutainer.

Conservación de las muestras de gases en Vacutainer.

Se inyectaron 54 tubos Vacutainer con 6 ml. de patrón de N₂O (51 ppmv $\pm$ 2.55 de N₂O en N₂), y se conservaron a tres temperaturas: 25°C, 4°C y -18°C. Transcurrido cada periodo de tiempo de conservación (0, 5, 13, 22, 26 y 32 días) se analizaron tres tubos (réplicas) por cada temperatura.

Comparación de metodologías para la medida de la desnitrificación potencial.

El suelo utilizado para las incubaciones fue recogido en un arrozal en el Delta del Ebro varias semanas antes de los experimentos. Sus características se detallan en la tabla I:

Tabla I: Características del suelo empleado para la determinación de la desnitrificación potencial. Todos los valores en porcentajes (%), excepto el de C/N: (a) granulometría. (b) composición elemental.

ARENAS GRUESAS	ARENAS FINAS	LIMOS GRUESOS	LIMOS FINOS	ARCILLAS	(a)
37.58	20.05	6.56	31.76	4.04	

C	N	C/N	(b)
5.55	0.16	41.3	

Muestras de los 10 cm. superiores del suelo fueron secadas al aire y tamizadas por una malla de 2 mm. Se incubaron 5 grs. de suelo en frascos de suero de 125 ml. Los frascos fueron sellados herméticamente, remplazando el aire por helio para lograr una atmósfera anaeróbica. A todos los frascos se les añadió una solución de nitrato potásico y glucosa (16 mM y 2.5 mM respectivamente) y acetileno al 12% v/v. Los frascos se incubaron a 28°C, en 6 grupos correspondientes a 6 tiempos de incubación (0, 2, 4, 6, 10 y 24 hrs.). Una vez terminada la incubación se añadió a los frascos del experimento I 1 ml. de HgCl_2 0.04% para paralizar cualquier proceso biológico y se conservaron los frascos a 4°C. Los frascos del experimento II se conservaron a -18°C sin HgCl_2 .

Las muestras de gases se recogieron de la atmósfera de los frascos al finalizar las incubaciones y antes de poner los frascos en nevera o congelador.

Las muestras de gases que no eran analizadas de inmediato se conservaron en tubos al vacío Vacutainer (Beckton & Dickinson) de 5 ml. (capacidad real 5.5 ml.).

Los análisis de nitratos, nitritos y amonio se realizaron después de extracción con agua desionizada (experimento I) o con KCl 1M (exp.II), en autoanalizador (Technicon Autoanalyzer).

Análisis de las muestras de gases.

El análisis de las muestras se realizó con un cromatógrafo de gases HP 5890A, dotado con un detector de captura de electrones (ECD) y dos columnas Porapak Q (1/8" x 3.10m.long.) conectadas en paralelo. Las temperaturas de las columnas, inyector y detector eran de 67, 100 y 300°C respectivamente, y el flujo de gas portador (N_2) de 21.5 ml/min. El cromatógrafo se adaptó para el análisis de muestras con acetileno instalando una válvula de 10 ports entre el inyector y las dos columnas, de manera que mientras una muestra está siendo separada por una de las dos columnas, por la segunda columna circula gas portador en sentido inverso y con flujo elevado (45 ml/min.), limpiando ésta última de restos de la muestra anterior (acetileno, vapor de agua). Con este sistema se consigue que el acetileno no pase por el detector, al que satura durante algunos minutos, y por lo tanto los tiempos de análisis se reducen a 5 minutos por muestra. (Lescure, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSION

Medida de los contaminantes en los Vacutainer.

Se encontraron residuos de diferentes gases en los Vacutainer, entre ellos un residuo de N_2O de 1.35 ± 0.2 ppmv. Estos residuos son debidos al proceso de esterilización al que son sometidos los Vacutainer en su origen.

Efecto del Vacutainer en la conservación de las muestras.

Comparando medidas efectuadas a partir de muestras recogidas en Vacutainer con muestras medidas directamente del frasco de incubación, se ha comprobado que existe en el primer caso una disminución de la concentración de N_2O que debe ser considerada para el cálculo de los resultados. La disminución es de $9.44 \% \pm 1.88 \%$ cuando los Vacutainer se llenan con 6 ml. de muestra (C.V. de 20 %; n=9). Se ha de tener en cuenta que la disminución de 9.44 % incluye la contaminación inicial de la muestra con los residuos antes mencionados.

Conservación de las muestras de gases en Vacutainer.

La temperatura de conservación de los Vacutainer es importante cuando el volumen de muestras impide el análisis en un plazo de tiempo corto de todas las muestras. Vacutainer conservados a 25°C y a 4°C han perdido 9.12 % y 5.16 %, respectivamente, de su concentración inicial en 13 días (además de la disminución de 9.44 % debida al llenado de los Vacutainer); conservados a -18°C pierden en el mismo periodo de tiempo sólo un 2.74 %.(Fig.1, tabla II).

Fig.1: Conservación de N_2O (%) en Vacutainer a diferentes temperaturas.

Tabla II: Porcentaje de $N-N_2O$ perdido en Vacutainer conservados a diferentes temperaturas. No se considera la disminución inicial de concentración del gas (9.44 %).

TIEMPO DE CONSERVACION (dias)	-18°C	4°C	25°C
0	0.42	1.13	0.71
5	2.57	7.06	12.06
13	2.74	5.16	9.12
22	2.36	6.56	9.51
26	3.59	7.38	10.92
32	1.25	10.97	11.69

Comparación de metodologías para la medida de la desnitrificación potencial.

La variabilidad en los resultados obtenidos empleando la disminución de nitratos como descriptor del proceso de desnitrificación es mayor (1-15, C.V. de 1-17%) que utilizando el método de inhibición de la N_2O -reductasa con acetileno

(0.0-0.24; C.V. 0-16%) debido a una mayor manipulación de las muestras en el primero de los métodos.

Se ha de tener en cuenta además que al medir la reducción de los óxidos de N, nitrato y nitrito, estamos sobrestimando la desnitrificación. Como podemos ver en la tabla III, la desaparición de nitratos añadidos es casi total en ambos experimentos, sin embargo se recuperan como N_2O en el primer caso sólo un 50 % y en el segundo menos de un 25 %. Esto es debido a una segunda vía de reducción de los óxidos de N cuyo producto es el amonio (reducción disimilatoria o amonificación de nitratos) (Koike & Sorensen, 1988). En el experimento I sólo se detecta una producción de amonio de 1.93 % del nitrato incorporado, debido en parte a que la extracción de amonio del sedimento se realizó con agua y en parte a una ligera retención del amonio producido en el sedimento (datos no publ.). En cambio en el experimento II el amonio detectado al final de las incubaciones es de 11.24 %, porque todo el amonio producido y retenido por el sedimento es extraído por la solución de cloruro potásico. Aún teniendo en cuenta el amonio producido, no se recupera todo el nitrato añadido en ninguno de los dos experimentos. Es probable que la inmovilización de amonio por parte de los microorganismos del suelo explique este resultado.

Tabla III: Nitrógeno recuperado (%) después de 24 h de incubación en los experimentos I y II.

	N- NO_3^- consumido	N- N_2O producido	N recuperado ¹
exp.I	99.75	52.40	66.39
exp.II	97.58	23.20	74.93

(1) % N recuperado = $(N-NO_3^- + N-NO_2^- + N-N_2O)$. No se tiene en cuenta el amonio para el cálculo del N recuperado puesto que la extracción de amonio en ambos experimentos se realizó con soluciones de fuerza iónica distinta (agua desionizada y KCl 1M).

CONCLUSIONES

De los resultados anteriores se deriva que, para experimentos de desnitrificación de laboratorio, es recomendable analizar las muestras de gases directamente del frasco de incubación, evitando así la dilución involuntaria de la muestra en el Vacutainer. Sin embargo la conservación de las muestras en Vacutainer y a temperatura muy baja ($-18^\circ C$) es eficaz cuando el número de muestras a analizar es muy elevado o cuando se estima la desnitrificación in-situ.

Comparando la reducción de nitratos con la técnica de inhibición con acetileno podemos ver que cuando se utilizan simultáneamente ambas metodologías obtenemos mucha más información que utilizando sólo una de ellas. Si sólo consideramos la reducción de nitratos estaremos sobreestimando la desnitrificación, puesto que parte de los nitratos son reducidos a amonio. También hemos de tener en cuenta que el amonio formado por reducción de nitratos puede ser retenido por el sedimento o ser inmovilizado por los microorganismos del suelo, por lo que el amonio medido al final de las incubaciones integra todos estos procesos.

BIBLIOGRAFIA

- Knowles, R. 1981. Denitrification. *In*: Clark, F.E. & T. Ross wall (eds.). *Terrestrial Nitrogen Cycles. Processes, Ecosystem Strategies and Management Impacts*. Ecol. Bull. (Stockholm) 33, 315-330.
- Koike, I. & J. Sorensen. 1988. Nitrate Reduction and Denitrification in Marine Sediments. *In*: Blackburn, T.H. & J. Sorensen (eds.) Nitrogen cycling in coastal marine environments. (SCOPE 33). pp.251-273. John Wiley & Sons. NY.
- Lescure, 1987. Relation bassin versant-étang: étude quantitative de l'azote inorganique dans les échanges atmosphère-sol-eau. Thèse Doctorat de Troisième Cycle. Université Claude Bernard Lyon I.
- Seitzinger, S.P. 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. Limnol. Oceanogr., 33(4, part 2), 702-724.
- Sprent, J. 1987. *The Ecology of the Nitrogen Cycle*. (Cambridge Studies in Ecology). Cambridge University Press.
- Stolp, H. 1988. *Microbial Ecology: Organisms, Habitats, Activities*. (Cambridge Studies in Ecology). Cambridge University Press.
- Tiedje, J.M., A. Sexstone, D.D. Myrold & J.A. Robinson. (1982). Denitrification: ecological niches, competition and survival. Antonie Van Leeuwenhoek 48, 569-583.
- Tiedje, J.M., S. Simkins & P.M. Groffman. 1989. Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. Plant and Soil 115, 261-284.