



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía - Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

**Mecanismos de acción de extractos de plantas sobre
procesos de nitrificación y evaluación biotecnológica para
su uso**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas mención
en Suelos

FRANCO ANTONIO WEISSER GÓMEZ
CHILLÁN-CHILE
2014

Profesor Guía: Cristina Muñoz Vargas
Dpto. de Suelos, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Mecanismos de acción de extractos de plantas sobre procesos de nitrificación y
evaluación biotecnológica para su uso

Aprobada por:

Cristina Muñoz Vargas
Ing. Agrónomo, Dr. Cs. Rec. Naturales

Profesora Guía

Macarena Gerding González
Ing. Agrónomo, PhD. Microbiología

Evaluadora Interna

Iván Vidal Parra
Ing. Agrónomo, M.Sc., Dr.Cs. Nutrición Vegetal

Evaluador Interno

Inés Figueroa Cares
Ing. Agrónomo, M.Sc., Dr. Cs. en Horticultura

Directora de Programa



AGRADECIMIENTOS

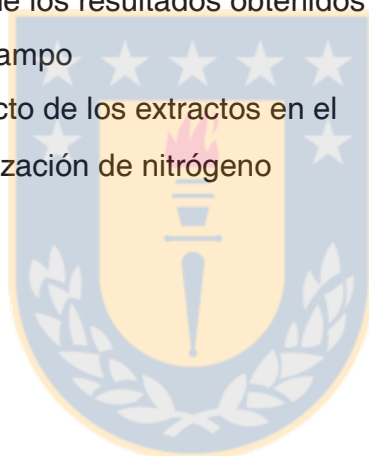
La presente investigación fue financiada por el Proyecto Fondecyt N° 11100136 “A biotechnological alternative for reduce soil N losses and greenhouse emission from soils”.



TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Resumen	3
Summary	3
Introducción	5
- Emisión de gases de efecto invernadero desde el suelo	5
- Inhibidores comerciales de la nitrificación y modos de acción	6
- Inhibidores de nitrificación de origen vegetal y modos de acción	8
- Alternativas biotecnológicas	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
- Objetivo general	12
- Objetivos específicos	12
Materiales y Métodos	13
- Etapa I. Caracterización y análisis de modos de acción	13
- Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre bacterias oxidantes del amonio	13
- Análisis de la composición de extractos vegetales	14
- Actividad enzimática	14
- Ensayo de precipitación de proteínas	15
- Etapa II. Alternativa biotecnológica	15
- Recubrimiento de gránulos de urea	15
- Análisis de la eficiencia de uso del fertilizante	16
- Transformación a N mineral	16
- Biomasa microbiana en el suelo	17
- Ratificación del efecto de los extractos en el proceso de mineralización de nitrógeno	17
- Diseño estadístico	17
Resultados y discusión	18

- Etapa I. Caracterización y análisis de modos de acción	18
- Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre bacterias oxidantes del amonio	18
- Composición de extractos vegetales	19
- Actividad enzimática	20
- Ensayo de precipitación de proteínas	21
- Etapa II. Alternativa biotecnológica	23
- Análisis de la eficiencia de uso del fertilizante	23
- Transformación a nitrógeno mineral	24
- Biomasa microbiana del suelo	27
- Discusión general de los resultados obtenidos en ensayo a nivel de campo	29
- Ratificación del efecto de los extractos en el proceso de mineralización de nitrógeno	30
Conclusión	32
Referencias	32
Apéndices	39



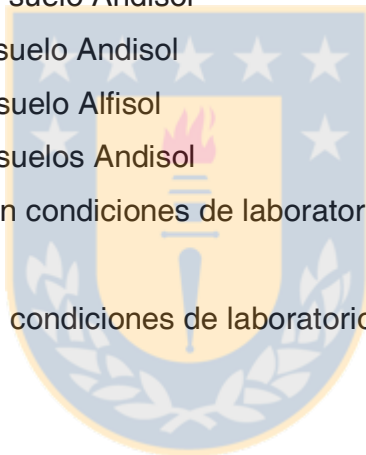
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

	Página
1.- Composición de extractos vegetales	20
2.- Caracterización de la capacidad de precipitar proteínas	22

Figuras

1.- Determinación de bacterias oxidantes del amonio	18
2.- Ureasa en sistema modelo	21
3.- Recuperación de nitrógeno en suelo Andisol	24
4.- Contenido de amonio en suelo Alfisol	25
5.- Contenido de nitrato en suelo Alfisol	26
6.- Contenido de amonio en suelo Andisol	27
7.- Contenido de nitrato en suelo Andisol	27
8.- Biomasa microbiana en suelo Alfisol	28
9.- Biomasa microbiana en suelos Andisol	29
10.- Contenido de amonio en condiciones de laboratorio, incubado por 14 días	31
11.- Contenido de nitrato en condiciones de laboratorio, incubado por 14 días.	31



MECANISMOS DE ACCIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE PROCESOS DE NITRIFICACIÓN Y EVALUACIÓN BIOTECNOLÓGICA PARA SU USO

MODE OF ACTION OF PLANT EXTRACTS ON THE NITRIFICATION PROCESSES AND BIOTECHNOLOGICAL EVALUATION TO THEIR USE

Palabras índice adicionales: nitrógeno, inhibidores de la nitrificación, actividad enzimática, biomasa microbiana.

RESUMEN

Los inhibidores de la nitrificación (IN) como estrategia para aumentar la eficiencia de uso del nitrógeno (N) proveniente de fertilizantes amoniacales, está siendo cada vez más utilizada en agricultura extensiva. La forma más común es incorporando los IN en la formulación de fertilizantes que están incluidos en paquetes tecnológicos recomendados por empresas agrícolas para ciertos cultivos. Se ha demostrado que algunos IN comerciales pueden generar efectos citotóxicos además de los efectos perjudiciales demostrados y potenciales que estos pueden ocasionar al medio ambiente, considerando que algunos de ellos presentan compuestos organoclorados. Por esta razón, se ha hecho necesaria la existencia de alternativas amigables de IN con el medio ambiente e inocuas para los cultivos en los que se apliquen. Así, se ha dado origen a los IN de origen natural cuyos modos de acción y efectividad fueron evaluados en la presente investigación incluyendo una alternativa de aplicación en condiciones de campo. Los extractos naturales presentan un verdadero potencial para ser usados como IN; sin embargo, la aplicación de estos en campo con la alternativa biotecnológica aquí evaluada, no generó los resultados esperados.

SUMMARY

The nitrification inhibitors (NI) as a strategy to improve the nitrogen use efficiency from ammonia fertilizers are increasingly used in extensive agriculture. The most

common way to incorporate the NI is in the formulation of fertilizers included in technologic packages recommended by agriculture companies for certain crops. It has been demonstrated that some commercial NI can generate cytotoxic effects besides the demonstrated and potential detrimental effect that they can do to the environment, considering that some of them include organochlorine compounds. For this reason, it became necessary to find alternatives of NI environmentally friendly and harmless to the crops. Thus, natural NI have been created whose mode of action and effectiveness were evaluated in the present research including an application alternative under field conditions. Plants extract have a truly potential to be used as NI. However, their application in the field with the biotechnological alternative here evaluated, did not generate the expected results.

INTRODUCCIÓN

Emisión de gases de efecto invernadero desde el suelo

Los gases de efecto invernadero (GEI) de mayor importancia, ya sea por su cantidad o potencial de efecto invernadero, son el dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O), entre otros (Ussiri *et al.*, 2009). Donde las actividades agropecuarias representan un sector de grandes emisiones de estos gases a la atmósfera (Cole *et al.*, 1997; McGinn, 2005).

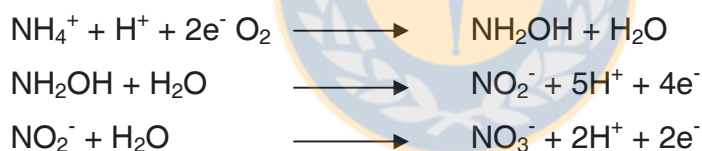
El efecto directo de los GEI en el calentamiento global radica en la capacidad de estos gases de absorber la energía radiante emitida en forma de calor desde la superficie terrestre, lo que permite mantener la temperatura del planeta en los rangos en los que es posible el desarrollo de los organismos vivos presentes. Sin embargo, cuando la cantidad de GEI excede los límites en los que estos retienen la energía calórica adecuada, se origina un exceso de acumulación de calor en el planeta. Este fenómeno genera variados cambios perjudiciales en los ciclos medioambientales, afectando entre otras cosas, la producción de alimentos por efecto de los cambios climáticos.

La emisión de GEI tiene lugar en los suelos agrícolas debido a que existen etapas de las transformaciones de N en el suelo que tienen como producto final o

subproducto GEI, siendo el N_2O uno de los más dañinos por su gran potencial de efecto invernadero con los consiguientes perjuicios al ecosistema.

Cervantes-Carrillo *et al.* (2000) hacen referencia a dos de los procesos microbiológicos más importantes en la formación de N_2O desde el suelo, la nitrificación (ecuación 1) y desnitrificación (ecuación 2). En la nitrificación, bacterias especializadas, como las *Nitrosomonas*, oxidan el amonio (NH_4^+) en nitrito (NO_2^-), habiéndose formado previamente hidroxilamina (NH_2OH) como precursor del NO_2^- , y luego bacterias como las del género *Nitrobacter*, transforman el NO_2^- en nitrato (NO_3^-). Posteriormente, mediante procesos reductivos como la reducción no asimilatoria del NO_3^- o desnitrificación, las cuales se potencian bajo condiciones de anaerobiosis o limitaciones de oxígeno, reducen el NO_3^- originando gases de nitrógeno (N) como N_2O y N elemental (N_2) (Tisdale *et al.*, 1993). Estas reacciones están mediadas a su vez por diversas enzimas presentes en el suelo, como la enzima ureasa cuya actividad muestra significativa relación con la acción nitrificante en el suelo (Yan *et al.*, 2013).

Ecuación 1.



Ecuación 2.



Dado que las emisiones de N_2O son principalmente resultado de las transformaciones de N en el suelo, las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, pueden ocasionar graves perjuicios en el medioambiente, si éstas no son manejadas en forma adecuada. Es así que el NH_4^+ puede volatilizarse hacia amoníaco (NH_3) con efectos directos en procesos de generación de lluvia ácida. Por otra parte, el NO_3^- puede perderse fácilmente por lixiviación, contaminando napas subterráneas y cauces superficiales, y dar pie a la generación de N_2O con efecto directo en el calentamiento global (Singh y Verma,

2007). Diversos modelos y formas de cuantificar emisiones han sido desarrolladas para programar estrategias de mitigación (Hedley *et al.*, 2006).

Inhibidores comerciales de la nitrificación y modos de acción

En la actualidad, existen diferentes métodos para disminuir las emisiones de los GEI, entre ellos el uso de los inhibidores de la nitrificación (IN), productos químicos desarrollados para controlar los procesos de nitrificación y desnitrificación, que logran disminuir las pérdidas de N, generando a la vez sistemas más eficientes, menos contaminantes y de mayor producción, más aún si son combinados con prácticas de manejo con el mismo objetivo (Bhatia *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013). Los productos comerciales disponibles son en su mayoría de origen sintético, como Diciandiamida (DCD), Nitrapirina (NP), N-2,5-dicloro-fenil ácido succinámico (DSC) y 2-amino-4-cloro-6-metil pirimidina (AM), entre otros. Estos productos han sido utilizados en diversos suelos y cultivos, siendo los INs más comúnmente usados la NP comercializado principalmente en Estados Unidos, y DCD mayormente en Europa.

Respecto de los modos de acción de los INs comerciales, Singh y Verma (2007) indican que estos compuestos o agentes químicos intervienen en la oxidación del NH_4^+ a NO_2^- , inhibiendo este proceso o interfiriendo en el metabolismo de bacterias nitrificantes o enzimas (McCarty, 1999). Esto con la consecuente disminución de la tasa de nitrificación, por un período de hasta 35 días (Zaman *et al.*, 2009).

Normalmente los INs actúan selectivamente, esta selectividad se debe a que la inhibición afecta la actividad de microorganismos o enzimas específicas que solo influyen en la primera etapa de la nitrificación. Así, para los casos donde las bacterias son inhibidas, comúnmente inhiben la actividad de bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas*. En tanto, para el caso de la inhibición de enzimas, una de las enzimas afectada es la amonio monooxigenasa (AMO), como por ejemplo con el uso de inhibidores como disulfuro de carbono (CS_2) o tioéteres entre otros; o en el caso de la inhibición de la enzima ureasa es el nBPT (N-[N-butil] tiofósforo triamida). La AMO es una enzima indispensable para la oxidación del NH_4^+ a hidroxilamina (NH_2OH), elemento posteriormente catalizado por acción de

hidroxilamina óxidoreductasa y bacterias especializadas (McCarty, 1999), dando origen al NO_2^- (Singh and Verma, 2007), concluyendo así la primera oxidación en el proceso de nitrificación.

McCarty (1999) menciona que la inhibición de AMO, causada por algunos INs, se genera por competencia por el sitio activo de la enzima y que por la oxidación de ciertos compuestos, como el acetileno, resultan productos altamente reactivos, que forman enlaces covalentes con la misma enzima, causando una inhibición irreversible o también denominada inhibición suicida. Este modo de acción también puede ocurrir en la inhibición de la enzima ureasa. Se ha demostrado que más de 40 compuestos, tanto orgánicos como sintéticos, son sustratos de AMO, por lo que éstos sirven de inhibidores de la enzima en la oxidación de NH_3 ó NH_4^+ , por competencia por el sitio activo (McCarty, 1999).

Otro mecanismo de acción es el descrito para la NP, el cual se ha mencionado que posee un efecto tóxico para bacterias nitrificantes, como *Nitrosomonas* spp., debido a su acción quelante para iones metálicos como el cobre, el cuál es un co-factor de las enzimas que participan en la oxidación del NH_4^+ como la AMO (Campbell y Aleem, 1965; Singh y Verma, 2007). De esta manera mediante el uso de NP se ha logrado disminuir las emisiones de N_2O en más de un 65 % a diferentes temperaturas y contenido de humedad, en un suelo franco arcilloso de pH 8,3 (Chen *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que el DCD centra su efecto inhibitorio sobre las poblaciones de bacterias oxidantes del NH_4^+ , sin embargo no afectaría mayormente la actividad de comunidades bacterianas generales del suelo (O'Callaghan *et al.*, 2010).

Un IN que ha ingresado al mercado en los últimos años es 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP), el cual no es un compuesto organoclorado y con su uso en praderas, se han logrado reducciones en las emisiones de N_2O en igual cantidad que las alcanzadas con el uso de DCD, con la ventaja de que se requiere menor cantidad de producto y sin generar fitotoxicidad en el trébol (Macadam *et al.*, 2003). Con DMPP se redujo la concentración de NO_3^- en los lixiviados en un 44,9 y 56,6 % en dos años consecutivos en una rotación de arroz-raps. Este IN provocó una disminución de un 24,5 y 30,9 % en la población de bacterias oxidantes del

NH_4^+ y 14,7 y 31,6 % en la actividad de la enzima nitrito reductasa, para los dos años respectivos (Hua *et al.*, 2008).

Pese a que los INs han sido estudiados hace muchos años, siendo DCD uno de los primeros en ser materia de estudio (McGuinn, 1924), no existen estudios que revelen los posibles efectos secundarios, originados de su constante aplicación en los suelos; y considerando que algunos como DSC, AM y NP son organoclorados, se podría esperar que generaran efectos adversos a largo plazo. Por otro lado, Singh y Verma, (2007) dan cuenta de la peligrosidad de la NP la cuál sería corrosiva y explosiva. Además, Macadam *et al.*, (2003) indican que el DCD generaría fitotoxicidad, bajo ciertas condiciones y cultivos, como por ejemplo, en trébol blanco (*Trifolium repens L.*), produciendo clorosis y necrosis en las hojas y una disminución del rendimiento.

Inhibidores de nitrificación de origen vegetal y modos de acción

En respuesta a los efectos adversos mencionados anteriormente y a posibles efectos negativos no descubiertos provenientes de los inhibidores sintéticos, alternativas amigables con el medio ambiente han sido desarrolladas. Esto ha sido posible gracias al descubrimiento de la capacidad de algunas especies vegetales de sintetizar compuestos orgánicos inhibidores de procesos biológicos del suelo, particularmente de la nitrificación, a nivel de la transformación de NH_4^+ a NO_2^- , con el propósito de hacer más eficiente el uso del N en condiciones en las que éste y otros nutrientes son de escasa disponibilidad (McCarty, 1999; Lata *et al.*, 2004). EL siguiente paso es descubrir cuáles, específicamente, son estos compuestos inhibidores y sobre qué grupos microbiológicos actúan particularmente para inhibir finalmente la nitrificación. La identificación y conocimiento de estos grupos es fundamental para la investigación con miras a la aplicación de estos compuestos a la agricultura, sin riesgos de efectos ambientales perjudiciales y con el aumento en la eficiencia de utilización del N.

Existen estudios desarrollados con el objetivo de encontrar especies que presenten inhibición de procesos biológicos relacionados con las transformaciones del N, o que buscan identificar estructuras de plantas, como raíces, tallos u hojas con mayor efecto inhibitorio sobre estas transformaciones. Suescún *et al.* (2012),

evaluaron distintos extractos vegetales crudos, encontrando una disminución en la tasa de nitrificación en el suelo con los extraídos de raíz de *Acacia caven* Mol. en agua, corteza de *A. caven* en etanol, corteza de *Pinus radiata* D. Don. en etanol (Cpe), hojas de *P. radiata* en agua y raíz de *Bacharis linearis* Pers. en agua. Sin embargo, en el mismo estudio los autores revelaron que solo el extracto de Cpe redujo la biomasa microbiana del suelo. Al respecto, los autores concluyen que la cantidad de taninos condensados y fenoles presentes en los extractos vegetales, principalmente el extracto Cpe, influirían en parte, en el efecto inhibitorio sobre la nitrificación, respiración microbiana y biomasa microbiana del suelo.

Lata *et al.* (2004) estudiaron la inhibición microbiana generada por *Hyparrhenia diplandra* (Poacea común en África), trasplantando plantas provenientes de lugares donde había baja nitrificación, a lugares donde ésta era más alta en condiciones naturales. Observaron que se generó una disminución de la actividad de enzimas nitrificantes en la nueva ubicación, concluyendo que la inhibición sobre microorganismos nitrificadores generada por las plantas estudiadas, sería mediante compuestos fenólicos y compuestos tánicos exudados en forma radicular. Majumdar (2002) demostró, a nivel de laboratorio, que karanjín, un furano flavonoide obtenido de las semillas de Karanja (*Pongamia glabra* Vent.) (árbol común en India y Australia), aplicado con urea tiene un efecto inhibitorio de la nitrificación y en la mitigación de emisión de N₂O, significativamente mayor que el de DCD aplicado con urea en diferentes dosis. Así, mediante el uso de karanjín se redujo la nitrificación entre un 62 y 65 % y las emisiones de N₂O entre 92 y 96 %, mientras que con DCD las disminuciones fluctuaron en 9 y 42 %, y 60 y 71 % respectivamente, obteniendo el mayor efecto inhibitorio de emisiones de N₂O con la mezcla de urea con karanjín (100 mg kg⁻¹ de suelo con karanjín al 25 %). A nivel industrial se han desarrollado productos basados en karanjín para formular pesticidas, Majumdar (2008) postula que estos mismos podrían presentar efectos inhibitorios sobre la nitrificación, por la presencia del furano flavonoide y que por lo tanto, debieran ser probados para evaluar su uso como IN.

Después de hacer aplicaciones con extractos vegetales con bajo contenido de fenoles y taninos condensados con el propósito de relacionar el efecto de ciertos fenoles y taninos condensados sobre los procesos de nitrificación, Suescún *et al.* (2012) evidenciaron que estos no mostraron efecto inhibitorio en la biomasa microbiana del suelo y reportaron un débil efecto en la actividad ureasa. Estos resultados permiten dilucidar que futuros ensayos investigativos debieran ser realizados enfocados a los mencionados compuestos orgánicos, en busca de inhibidores naturales de la nitrificación suficientemente efectivos para ser competitivos para los de origen comercial.

Patra *et al.* (2002), en un estudio realizado para identificar compuestos inhibidores presentes en los extractos vegetales, reportó una importante inhibición de la nitrificación causada por un tetranortriterpenoide conocido como *Nimin* (nombre en inglés), un extracto de alcohol de Neem (*Azadirachta indica* Juss), que derivó en aumento del rendimiento similar al generado por DCD en menta japonesa (*Mentha arvensis* L.).

El potencial inhibitorio sobre los procesos de la nitrificación que tendrían ciertos taninos y derivados de taninos hidrolizables podría llegar a tal punto de inhibir por completo la oxidación del NH_4^+ a NO_2^- por *Nitrosomonas* según un estudio realizado por Rice y Pancholy (1973), quienes demostraron este efecto usando pequeñas cantidades de estos compuestos como por ejemplo, 2 ppm de taninos condensados o hidrolizables, 0,17 ppm de ácido tánico, 0,003 ppm de ácido digálico y elágico, y 0,02 ppm de ácido gálico. Los mismos autores indican que estos compuestos también generaron una importante inhibición de la nitrificación por bacterias del género *Nitrobacter*, retardando la oxidación de NO_2^- a NO_3^- . Buscando efectos inhibitorios de la nitrificación en compuestos que no fueran taninos ni sus derivados Rice y Pancholy (1974), encontraron respuestas positivas en ácidos fenólicos o glucósidos fenólicos. Paavolainen *et al.* (1998) observó que monoterpenos (principalmente α y β -pinenos) mostraron inhibir significativamente el proceso de nitrificación en condiciones de laboratorio, al exponerlos a vapor de terpenos a concentraciones similares a las que fueron encontrados en suelos forestales.

Alternativas biotecnológicas

Los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de otras alternativas para aumentar la eficiencia de uso de los fertilizantes, y disminuir los efectos perjudiciales para el medio ambiente que estos tienen. Una de las aplicaciones más conocidas para la agricultura es el uso de fertilizantes de liberación lenta (FLL) o de liberación controlada (FLC). Aunque no hay una diferencia oficial, usualmente se les denomina FLL a aquellos que el retardo de la disponibilidad de los elementos nutricionales depende de la acción de microorganismos, mientras que para los FLC, esta acción es mediada por barreras físicas, como encapsulación o materiales de recubrimiento (Trenkel, 1997). Considerando esta observación, el principio de los FLC consiste en retardar la disolución de los fertilizantes en el suelo mediante el uso de materiales de recubrimiento de los gránulos, de manera de interponer barreras físicas entre la solución del suelo y los gránulos de fertilizante (Han *et al.*, 2009). El material de recubrimiento debe descomponerse paulatinamente, permitiendo el contacto del fertilizante con la solución del suelo dando lugar a la dilución, o liberación del nutriente para transformarse a las formas disponibles para las plantas por las vías anteriormente descritas, a una velocidad similar a la que se generan las necesidades del cultivo.

Un estudio realizado por Shoji *et al.* (2001) muestra que con una aplicación de 112 Kg N ha⁻¹ con un FLC (urea recubierta con poliolefina) se logró un rendimiento igual al obtenido con una fertilización tradicional, en la que se utilizó un total de 269 Kg N ha⁻¹. Sin embargo, afirma que la proporción de tubérculos de gran calibre fue considerablemente menor. También mostró, en el mismo estudio que la reducción de las emisiones de N₂O en un cultivo de cebada con el uso del FLC fue de un 35 %, mientras que la reducción obtenida mediante DCD alcanzó un 85 %.

Para el caso en particular de la obtención de IN de origen orgánico, lo requerido es un material de recubrimiento o encapsulante inocuo que permita la aplicación del compuesto inhibidor en cultivos. Un estudio reciente realizado por Quilodrán (2013) mostró que el bicarbón (producto de la pirolisis de material vegetal) podría ser una alternativa biotecnológica amigable con el medio ambiente que ayudaría a mantener activa la capacidad inhibitoria de extractos vegetales en

el suelo, ya que serviría como una matriz dónde el material vegetal podría resguardarse, manteniendo sus características y dejándolo disponible para actuar en los procesos de inhibición en el suelo. El autor mostró que con el uso de biocarbón mezclado con extracto de corteza de Pino (*Pinus radiata* D. Don) fue posible reducir los niveles de nitrato en el suelo en el que fue probado (serie Arrayán) en hasta un 30 %.

Como material de recubrimiento, una alternativa para compuestos orgánicos es el aceite de ricino (*Ricinus communis* L.), especie arbustiva de cuyas semillas se extrae un aceite de uso industrial, principalmente para barnices y lubricantes. Con el uso de éste aceite se ha logrado mantener las propiedades inhibitorias de la nitrificación de materiales vegetales utilizándolo para recubrir gránulos de urea con los extractos estudiados (Patra *et al.*, 2002). Mediante esta técnica, Kiran y Patra (2003) recubrieron gránulos de urea con aceite esencial de Menta Japonesa (*Mentha arvensis* L. Var. Piperascens) logrando retrasar la producción de nitrato en el suelo tan efectivamente como DCD, sugiriendo por lo tanto, que la urea recubierta con material vegetal puede ser un potencial inhibidor de la nitrificación.

HIPÓTESIS

Extractos de plantas con probado efecto inhibidor a nivel de laboratorio, podrían ser usados en sistemas agrícolas, reduciendo las pérdidas de N desde el suelo, con similar eficiencia que un IN de origen sintético.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los mecanismos de acción y una alternativa de formulación de extractos vegetales con probado efecto sobre la mineralización de N en el suelo, con el fin de obtener un producto alternativo inocuo que reduzca las pérdidas de N desde los suelos agrícolas.

Objetivos específicos

1. Identificar los modos de acción de extractos vegetales con probado efecto sobre los procesos de transformación del N en el suelo.

2. Evaluar una alternativa de formulación para prolongar la acción inhibitoria de los extractos vegetales sobre las transformaciones de N en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa I. Caracterización y análisis de modos de acción

De acuerdo a estudios previos, realizados en el Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción, distintos extractos vegetales fueron seleccionados para desarrollar la presente investigación. A nivel de laboratorio, se utilizaron 6 extractos vegetales, seleccionados, basado en trabajos anteriores (Medina, 2011; Suescún *et al.*, 2012), por reunir la mayor cantidad de efectos favorables en cuanto a su acción inhibitoria de procesos de nitrificación y otros procesos biológicos relacionados a la transformación de N en el suelo. Los extractos vegetales seleccionados y sus dosis de aplicación (basado en el contenido de sólidos totales) se indican a continuación:

Extracto 1: Hoja de Peumo (*Cryptocarya alba*), equivalente a 20 Kg ha⁻¹ (Hp)

Extracto 2: Corteza de Peumo (*Cryptocarya alba*), equivalente a 20 Kg ha⁻¹ (Cp)

Extracto 3: Hoja de Eucalipto (*Eucalyptus globosus*), equivalente a 20 Kg ha⁻¹ (He)

Extracto 4: Corteza de Eucalipto (*Eucalyptus globosus*), equivalente a 5 Kg ha⁻¹ (Ce)

Extracto 5: Hoja de Quillay (*Quillaja saponaria*), equivalente a 20 Kg ha⁻¹ (Hq)

Extracto 6: Corteza de Acacia (*Acacia caven*), equivalente a 20 Kg ha⁻¹ (Ca)

Con fines de comparar su efectividad con un IN sintético, se utilizó DCD, equivalente a 20 Kg ha⁻¹.

Los extractos fueron obtenidos con agua y posteriormente liofilizados previo a su utilización.

Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre bacterias oxidantes del amonio. Para conocer el efecto potencial de los extractos en una de las poblaciones microbianas más importantes en el proceso de la nitrificación, se realizó un análisis bacteriológico según la metodología propuesta por Schmidt y Belser (1994) basado en la cuantificación del Número Más Probable (NMP) (Woomer, 1994). Fue preparado un medio líquido para bacterias oxidantes de

amonio y posteriormente esterilizado mediante autoclave. Bajo una cámara de flujo laminar el medio de cultivo fue distribuido 0,9 mL de esta solución nutritiva en tubos Eppendorf. A partir de una suspensión de suelo más extracto vegetal en buffer fosfato, se realizaron diluciones en series de 10 hasta llegar a 10^{-6} . A partir de la dilución 10^{-3} (por cada una de las diluciones Eppendorf), se inoculó 4 tubos con medio nutritivo con 0,1 mL de la suspensión de suelo. Se trabajó con 4 repeticiones por cada tratamiento y 4 réplicas por tubo. Los tubos Eppendorf fueron mantenidos en incubación a 22 °C en oscuridad por 90 días. La cuantificación de colonias se basó en la determinación de nitrito (NO_2^-) mediante el viraje de color (rosado a rojo) con la reacción de difenilamina.

Análisis de la composición de extractos vegetales. Para identificar la composición química y los grupos funcionales de los componentes orgánicos contenidos en los extractos de plantas se realizó la caracterización química de ellos en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción. Donde el grado de polimerización de las moléculas orgánicas fue analizado mediante una columna Kromasil KR100-5C18RP-HPLC de 250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ (Eka Chemicals AB, Bohus, Sweden) en el equipo Agilent 1100 (Agilent Technologies, California, USA). Para el estudio de la distribución oligomérica se utilizó un equipo Lachrom Elite (Hitachi High Technologies America, USA), y una columna Lichrospher 100 Diol HILIC-HPLC de 250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ (Merck, Darmstadt, Alemania).

La determinación de C y N total de las muestras se realizó mediante el método de combustión seca (Tan, 1996), en un analizador elemental (Leco Truspec CN, USA) del Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

El análisis químico de los extractos vegetales fue realizado de acuerdo a la metodología de análisis de aguas en el Laboratorio de Servicio del Departamento de Suelos y Recursos Naturales de la Universidad de Concepción, Campus Chillán (Longeri *et al.*, 1979).

Actividad enzimática. El efecto de extractos vegetales sobre la actividad enzimática se evaluó en un sistema modelo, basado en la metodología descrita

por Gianfreda *et al.* (1995). La inhibición de la actividad de la enzima ureasa (1000 UI, Sigma Aldrich), se determinó en presencia de 8 mg de sólidos totales con cada extracto en contraste con una curva de ácido tánico (0 a 0,1 mM).

Ensayo de precipitación de proteínas. Para determinar el contenido de compuestos fenólicos en los extractos vegetales se utilizó la metodología descrita por Murillo y Méndez (2007), que utiliza la propiedad de los taninos de precipitar proteínas. Se mezclaron 0,5 mL de solución de extracto vegetal con 1 mL de gelatina: solución de cloruro de sodio (1 % de gelatina en NaCl al 10 %), 0,5 mL de urea en solución (10 M) y gotas de cloruro de hierro reactivo como indicador. La intensidad del color verde resultante es considerada como bajo (+), medio (++) o alto (+++) en contenido de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos totales de los extractos vegetales fueron determinados mediante colorimetría con reactivo de Folin-Ciocalteu. La absorbancia fue determinada a 760 nm usando espectrofotómetro UV/Vis (ThermoSpectronic, Genesys™ 5, USA), con estándares de ácido gálico para crear curvas de referencia desde 0 a 300 mg mL⁻¹. De acuerdo a la absorbancia registrada, se estableció una escala cualitativa de la capacidad de precipitar proteínas, asignando un símbolo +, ++ y +++ desde menor a mayor capacidad de precipitación.

Etapas II. Alternativa biotecnológica

De los 6 extractos evaluados en laboratorio, 3 fueron seleccionados para su evaluación a nivel de invernadero. La selección fue basada en los resultados obtenidos en la primera etapa de la investigación y en trabajos anteriores (Suescún *et al.*, 2012; Medina, 2011), evaluándolos en un suelo de origen volcánico del Orden Andisol perteneciente a la serie Arrayán (Medial, amorphic, thermic Humic Haploxerands), y un suelo originario de materiales graníticos del Orden Alfisol perteneciente a la serie Cauquenes (Fine, kaolinitic, thermic Ultic Palexeralf) (Stolpe, 2006).

Recubrimiento de gránulos de urea. El recubrimiento de gránulos de urea se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Patra *et al.* (2002) y Kiran y Patra (2003). Para ello, los gránulos de urea fueron recubiertos con aceite de ricino (*Ricinus communis*) en una proporción 100:1 (1 % base p/p), donde se mezclaron

mediante agitación (en agitador recíproco 150 rpm) los gránulos con el aceite y posteriormente se secaron por 24 hrs. Los gránulos recubiertos resultantes se mezclaron separadamente con los tratamientos en una proporción 100:1. Los gránulos con doble capa de recubrimiento fueron secados nuevamente por 24 hrs y almacenados hasta su uso.

Análisis de la eficiencia de uso del fertilizante

El ensayo se realizó a nivel de invernadero en un suelo Andisol de la Serie Arrayán. Se utilizaron potes de 4 L de capacidad, donde fueron trasplantadas 3 plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) por pote. La especie fue elegida por ser una planta de rápido crecimiento primaveral. Los suelos fueron fertilizados con los extractos vegetales formulados en recubrimiento de urea, con el equivalente a 100 Kg N ha⁻¹ en triplicado:

T1: urea recubierta con Hp

T2: urea recubierta con He

T3: urea recubierta con Ce

T4: urea con DCD

T5: urea

T6: sin urea

Al finalizar el período experimental, se cosechó la parte aérea y raíces de las lechugas, determinándose su contenido de N mediante combustión seca (Leco TruSpec® CN. MI, USA), obteniéndose el porcentaje de N recuperado mediante la siguiente ecuación (3) (Greenwood *et al.*, 1989):

$$\%N \text{ recuperado} = \frac{N \text{ pote fertilizado (mg pote}^{-1}) - N \text{ pote control (mg pote}^{-1})}{N \text{ aplicado (mg pote}^{-1})}$$

Transformación a N mineral. Para la medición de la transformación de la urea hacia N mineral (NO₃⁻ y NH₄⁺) en el suelo, se dispusieron 3,5 Kg de suelo en potes de 4 L de capacidad, manteniendo la humedad del suelo en un rango de 60-70% WFPS (del inglés: *water filled pore space*) por el período que duró el ensayo. En forma periódica se obtuvo una muestra de suelo (aproximadamente 50 g) y se

determinó el contenido de N mineral producido mediante espectrofotometría UV-Vis según las metodologías de Robarge *et al.* (1983) para las mediciones de nitrato (NO_3^-) y Longeri *et al.* (1979) para amonio (NH_4) las mediciones fueron realizadas hasta que los niveles de nitrato disminuyeron considerablemente y de forma permanente.

Biomasa microbiana del suelo. Paralelamente al estudio de N mineral explicado anteriormente, se analizó la actividad de la biomasa microbiana en cada período de colecta de suelo. Para ello, 1 g de suelo fresco se dispuso en un tubo de ensayo al cuál se le adicionó tampón fosfato sódico 60 mM a pH 7,6 en presencia de fluoresceína diacetato (FDA), incubándose durante 1 h a 25 °C. Posteriormente se detuvo la reacción y se filtró (Whatman N° 42). Determinándose la fluoresceína (F) liberada mediante el uso de un espectrofotómetro UV/Vis a longitud de onda de 490 nm. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{g F g}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Alef, 1995; Green *et al.*, 2006).

Ratificación del efecto de los extractos vegetales en el proceso de mineralización de N

Para ratificar el efecto resultante del ensayo en invernadero se dispuso, en un frasco de vidrio de 1 L de capacidad, 0,5 Kg del mismo suelo Andisol de la serie Arrayán, utilizado en el experimento de terreno. Fue incubado durante 14 días a 22 °C al 60 % WFPS con los tratamientos a tres dosis de aplicación: 5, 20 y 40 Kg Ha^{-1} para los tratamientos T1 y T2 (urea con extracto de hoja de peumo y urea con extracto de hoja de eucalipto) y 0,5, 5 y 20 Kg Ha^{-1} para el tratamiento T3 (urea con extracto de corteza de eucalipto). Además fue incluido un tratamiento control con urea sola con una aplicación equivalente a 100 Kg Ha^{-1} . Las condiciones de incubación fueron mantenidas en forma constante (22 °C y 60 % WFPS). Se incubaron los tratamientos por 14 días, haciendo mediciones cada 7 días del contenido de N mineral (NH_4^+ y NO_3^-) mediante la metodología de Longeri *et al.* (1979) y Robarge *et al.* (1983).

Diseño estadístico. Los ensayos consistieron en un diseño en bloques completamente al azar con 6 tratamientos cada uno y 3 repeticiones. Fue utilizado el programa InfoStat/Estudiantil, Versión 2013e. A los datos se les aplicó Test de

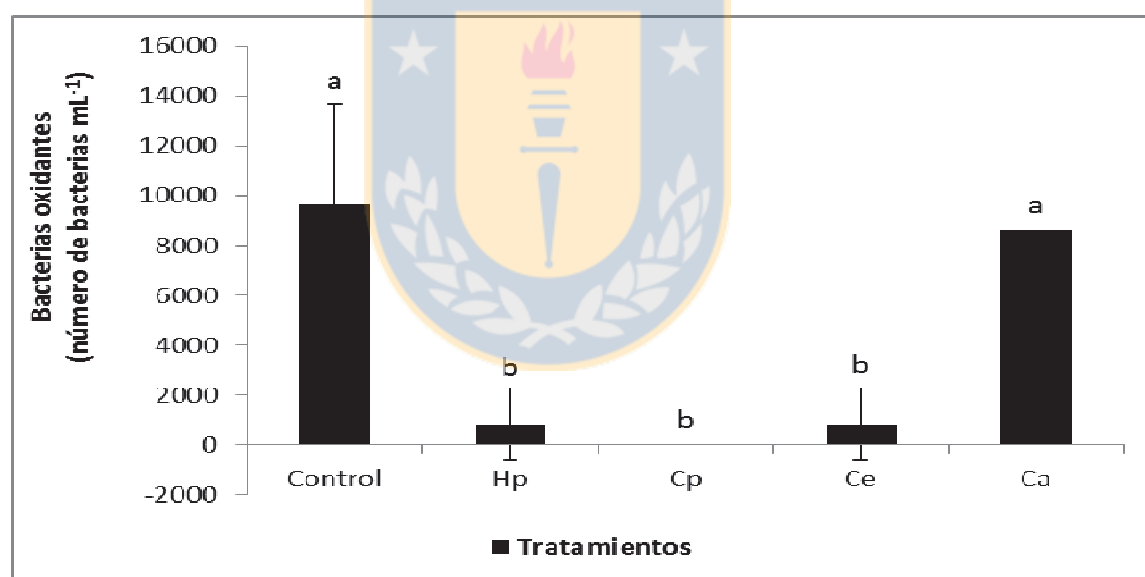
Duncan ($P \leq 0,05$) para comparaciones entre datos con distribución normal y Kruskal Wallis para aquellos a los que se les aplicó ANOVA no paramétrico. Para prueba de normalidad, se empleó el test de Shapiro Willks modificado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I. Caracterización y análisis de modos de acción

Evaluación del efecto de los extractos vegetales sobre bacterias oxidantes del amonio. La Figura 1 muestra la variación en el número de bacterias oxidantes del amonio causada por la presencia de los diferentes extractos de las especies vegetales evaluadas.

Figura 1. Enumeración de bacterias oxidantes del NH_4^+ . Hp: Hoja de Peumo; Cp: Corteza de Peumo; Ce: Corteza de Eucalipto; Ca: Corteza de Acacia. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan. $P \leq 0,05$).



Debido a una elevada dispersión de los resultados, no fue posible aplicar el presente análisis a los extractos de Quillay (Hq) y de hoja de Eucalipto (He), por lo que no fueron considerados para la presentación de los resultados y discusión.

Los extractos de corteza de Eucalipto (Ce), hoja de Peumo (Hp) y corteza de Peumo (Cp) mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$) frente al tratamiento control, producto de la actividad de las poblaciones bacterianas evaluadas bajo los

distintos tratamientos. Como muestra la Figura 1, los extractos Hp, Cp y Ce tuvieron un efecto inhibitorio importante sobre la actividad de bacterias oxidantes del amonio (NH_4^+). Por su parte, el extracto de corteza de Acacia (Ca) no mostró diferencias significativa con respecto al control.

La alta inhibición generada por Cp (99,9 % respecto al control) sería atribuida a un efecto inhibitorio sobre poblaciones bacterianas, lo que ha sido evidenciado en otra especie del mismo género (*Cryptocarya maclurei*) en ensayos a nivel de laboratorio sobre bacterias patógenas para especies animales (Feng *et al.*, 2013). Además se ha evidenciado citotoxicidad sobre bacterias gram positivas y negativas por un estudio conducido por Sivropoulou *et al.* (1995), entre ellas bacterias del género *Rhizobium*. Los extractos Hp y Ce también mostraron inhibiciones importantes (90 % con respecto al control).

Composición de extractos vegetales. La caracterización química de los extractos vegetales arrojó que en su mayoría, poseen una cantidad considerable de proantocianidinas, siendo el extracto de corteza de Peumo (Cp) el que la contiene en mayor cantidad, y el de hoja de Quillay (Hq) no presentó proantocianidinas en un rango detectable por el análisis (Tabla 1). Fue posible identificar que los monómeros que conforman el mencionado flavonoide serían principalmente catequinas y epicatequinas y que, la hoja de Eucaliptus (He) y corteza de peumo (Cp) presentarían el mayor grado de polimerización de sus moléculas orgánicas que los demás extractos.

Tabla 1. Composición extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; Cp: Corteza de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; Hq: Hoja de Quillay; Ca: Corteza de Acacia.

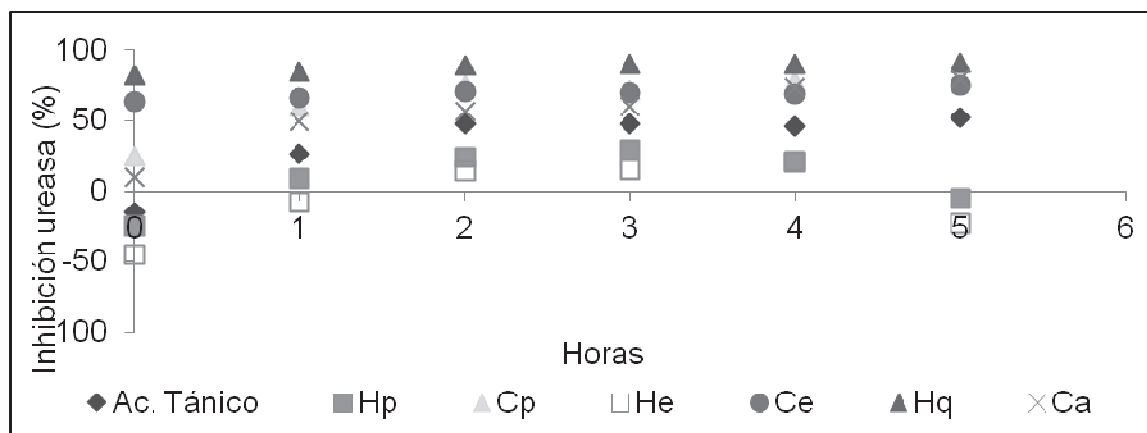
Fuente Vegetal	Proantocianidinas ^a	Tipo de Monómero ^b	DPm ^c
Hp	++	Epi/Cat	2.2
Cp	+++	Epi/Cat	3.8
He	+	Epi/Cat	4.0
Ce	+	Epi/Cat	2.3
Hq	--	-	1.1
Ca	+/-	Epi/Cat	2.3

^aProantocianidinas: Jerarquizados de acuerdo a la intensidad de la reacción con DMACA después de ser separadas en placas de silicagel TLC con tolueno/acetona/ácido fórmico (3+6+1 v/v). ^bTipo de Monómero: Obtenido a través de la identificación de los respectivos aductos formados por depolimerización con floroglucinol, donde Epi = Epicatequina y Cat = Catequina.

^cDPm: Grado de polimerización de acuerdo al análisis por HPLC de los productos de floroglucinólisis del extracto total.

Actividad enzimática. De la Figura 2 es posible inferir que la actividad de los extractos sobre la enzima ureasa tiene un efecto inhibitorio relevante. La mayoría de ellos (de mayor a menor inhibición: Hq, Ce, Cp y Ca) presentan un efecto incluso mayor que el del ácido tánico (inhibiendo más del 80 % de la actividad enzimática en el caso de Hq); siendo el ácido tánico utilizado como referencia por su conocida acción inhibitoria de la actividad de esta enzima (Gianfreda *et al.*, 1995). Incluso el extracto con Hp, si bien no presenta mayor inhibición que el ácido tánico, de igual forma tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática, disminuyéndola un 29 % a la hora 4 del experimento. El extracto que generó menos inhibición fue He, logrando su mayor expresión a la hora 4 (21 % de reducción de la actividad enzimática).

Figura 2. Actividad ureasa en sistema modelo. Hp: Hoja de Peumo; Cp: Corteza de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; Hq: Hoja de Quillay; Ca: Corteza de Acacia.



La positiva inhibición de los mencionados extractos vegetales es concordante con lo expuesto por Suescún *et al.* (2012), quienes evaluaron los mismos extractos y Yasmeen *et al.* (2012), que evaluaron una especie diferente de Eucaliptus más otras especies vegetales distintas a las evaluadas en el presente estudio, ambos basados en experimentos de laboratorio; sin embargo, concluyen que los extractos tienen el potencial para ser usados para elaborar un producto competitivo como inhibidor de la nitrificación.

Ensayo de precipitación de proteínas. La Tabla 2 muestra la precipitación de proteínas causada por cada uno de los extractos evaluados, según un análisis cualitativo.

Tabla 2. Caracterización de la capacidad de precipitar proteínas. Hp: Hoja de Peumo; Cp: Corteza de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; Hq: Hoja de Quillay; Ca: Corteza de Acacia.

Extracto	Precipitación proteínas
	Índice cualitativo
Hp	+++
Cp	+
He	++
Ce	++
Hq	++
Ca	+++

Los extractos vegetales que poseen mayor capacidad de precipitar proteínas, son Hp y Ca en igual proporción, seguidos de He, Ce y Hq. El extracto que mostró menor capacidad de formar complejos con proteínas es Cp. La repercusión de esta particularidad de los extractos en los procesos de transformación de N en el suelo, radica en la capacidad de ciertos metabolitos secundarios, entre ellos el ácido tánico y taninos condensados, de formar complejos con proteínas, dado que éstos pueden regular poblaciones microbianas y procesos que intervienen en el proceso de nitrificación en el suelo (Adamczyk *et al.*, 2013). Además, la propia acción de precipitar proteínas de los elementos presentes en los extractos vegetales podría tener lugar previo al proceso de nitrificación, formando complejos con proteínas del suelo que contienen el nitrógeno en su forma orgánica, impidiendo que éste quede disponible para ser mineralizado por los microorganismos del suelo.

Uno de los parámetros más importantes a evaluar en el presente estudio, fue el potencial que tuvieron los extractos vegetales para inhibir la actividad de la enzima ureasa, dada la importancia que ha demostrado esta enzima en los procesos de transformación de N en el suelo (Ladd y Jackson, 1982). La evaluación de la actividad ureasa en un sistema modelo indicó que la mayor inhibición se logró con el extracto de hoja de Quillay (Hq) con respecto a los

demás extractos, teniendo una inhibición de 91,3 %. Sin embargo, el mencionado extracto presentó niveles no detectables de proantocianidinas, contrario a los otros extractos que destacaron en su alto contenido de proantocianidinas. En adición, el extracto Hq presentó bajo nivel de polimerización con respecto a los otros extractos evaluados y mediana capacidad (indicada como ++ en la Tabla 3) de precipitar proteínas. Lo que estaría indicando que este extracto vegetal presentaría otro tipo de compuesto, distinto a los aquí evaluados, que serían responsables de la alta inhibición enzimática que presentó.

El extracto de corteza de peumo (Cp) logró una inhibición de la actividad ureasa que alcanzó un 80,2 %, teniendo un elevado contenido de proantocinidinas y alto grado de polimerización medio en sus moléculas orgánicas, lo que indicaría un efecto positivo de la presencia de compuestos fenólicos en los extractos sobre la inhibición de la enzima ureasa, coincidente con lo concluido por Chávez *et al.* (2011) tras un estudio usando extracto de cáscara de palta (*Persea americana* var. Hass) con experimentos a nivel de laboratorio. Además, He, con el mayor grado de polimerización entre los extractos evaluados y bajo contenido de proantocianidinas generó una baja inhibición de la enzima ureasa.

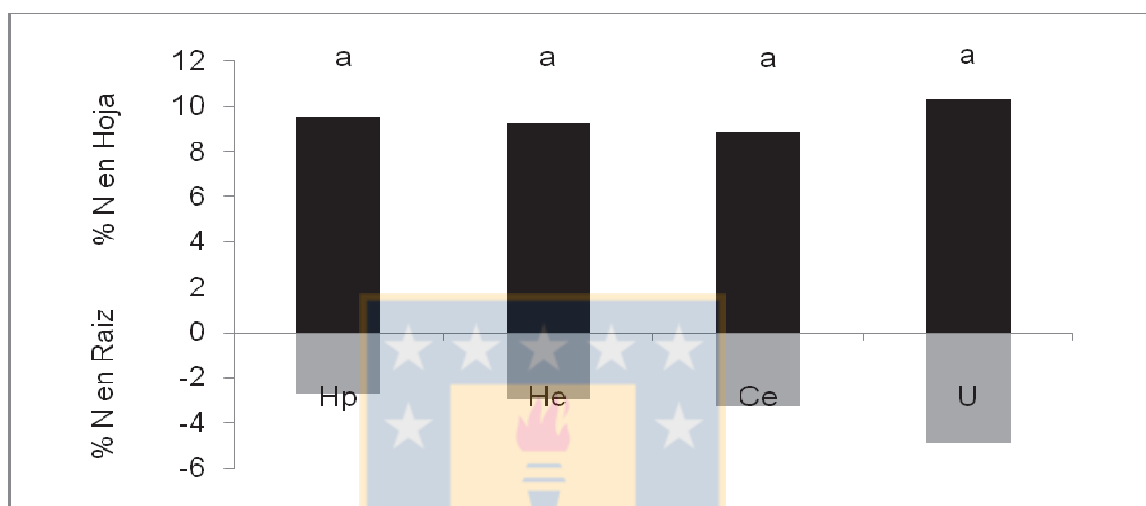
De lo recién expuesto, es posible inferir que los niveles de proantocianidinas no necesariamente tendrían una relación directamente proporcional con el grado de inhibición sobre la actividad ureasa en los extractos vegetales evaluados en este estudio. Al respecto, diversos autores plantean que la capacidad de estos compuestos de inhibir la actividad ureasa dependerá del grado de polimerización de las moléculas orgánicas que éstos tengan (Chávez *et al.*, 2011, Lotito *et al.*, 2000). Es así que el extracto de corteza de peumo (Cp) presentó además de un alto contenido de proantocianidinas un elevado grado de polimerización de la molécula, por lo que sería concordante con los estudios realizados por los autores antes mencionados.

Etapas II. Evaluación de una alternativa biotecnológica de uso de los extractos vegetales

Análisis de la eficiencia de uso del fertilizante. Los resultados obtenidos (Figura 3) muestran que la cantidad de N recuperado, tanto a nivel de raíz como el

encontrado a nivel de hoja, no mostró diferencia significativa ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos.

Figura 3. Recuperación de N en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en un suelo Andisol. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea sola. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan. $P \leq 0,05$).



* Para el análisis estadístico se consideró la sumatoria del porcentaje de N contenido en hojas y raíces.

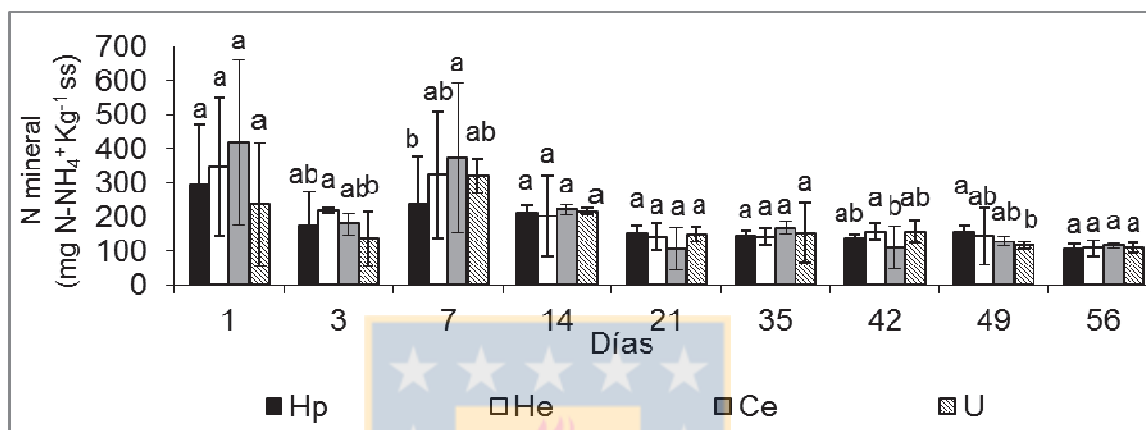
La recuperación de N en el tratamiento con DCD (7,6 %, Apéndice 3) tampoco fue diferente significativamente ($p \leq 0,05$). Lo que demuestra que ni los inhibidores naturales ni el DCD afectaron la absorción de N para las plantas utilizadas. Lo que concordaría con lo expuesto por Toselli *et al.* (2010) tras una aplicación de extractos vegetales de diferentes especies de *Meliaceae*s al suelo directamente. Para lo anterior debe tenerse en cuenta que el tiempo transcurrido durante el experimento fue determinado por las transformaciones de N en el suelo y no por el desarrollo fenológico de las plantas de lechuga, lo que podría ser la razón de la baja absorción de N.

Transformación a N mineral

Suelo Alfisol. La Figura 4 muestra la producción de amonio en cada uno de los tratamientos con extractos vegetales aplicados en el suelo Alfisol, donde se muestra que para el mencionado suelo. No se aprecian diferencias en

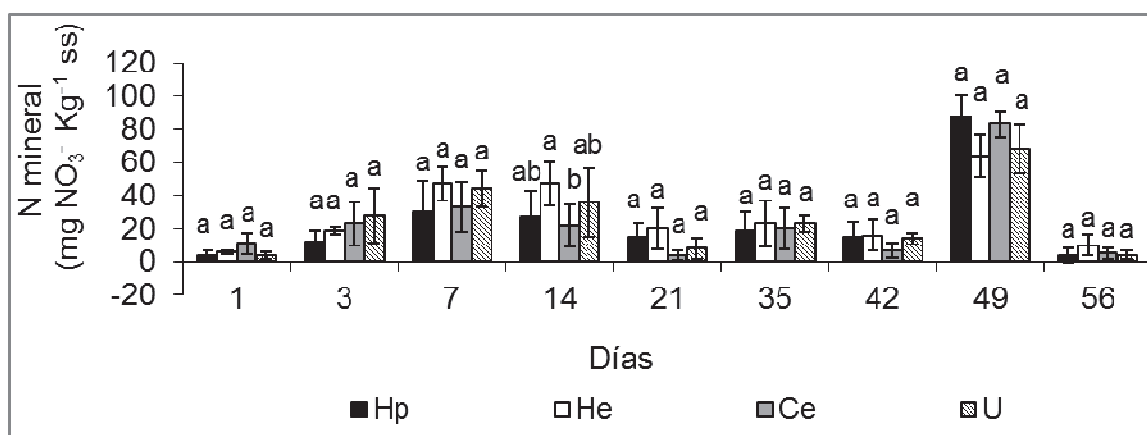
comparación con el suelo control, a excepción del día 3 post fertilización, donde He muestra significativamente ($p \leq 0,05$) mayor contenido de amonio.

Figura 4. Contenido de amonio en un suelo Alfisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).



En cuanto al contenido de nitrato para el mismo suelo, la Figura 5 muestra que los extractos evaluados no muestran mayor inhibición que el tratamiento control. Cabe mencionar que los mismos extractos vegetales han sido probados en estudios anteriores a nivel de laboratorio (Suescún *et al.*, 2012; Medina, 2011) siendo aplicados como extractos acuosos, con buenos resultados en la inhibición de la nitrificación, razón por la cual fueron elegidos para este estudio. Al aplicarlos con la formulación acá propuesta (usado como recubrimiento de fertilizante), los resultados muestran que no hay un efecto sobre la inhibición de la nitrificación para este tipo de suelo.

Figura 5. Contenido de nitrato en suelo Alfisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).

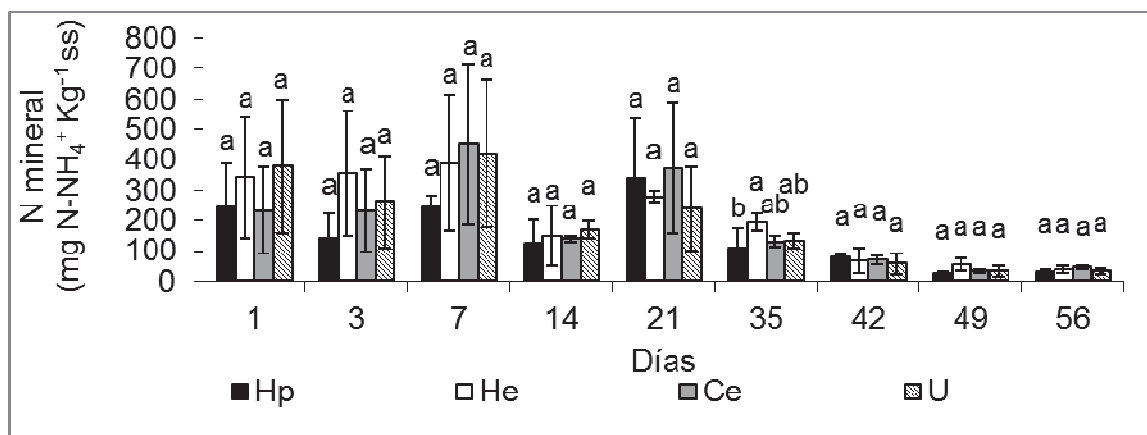


La nula diferencia obtenida por efecto de los extractos sobre el proceso de nitrificación, representada en la Figura 5, podría sugerir que los extractos no son efectivos en el suelo en el que fueron aplicados para su evaluación (Alfisol).

Otros estudios utilizando la técnica de recubrimiento de la urea con extractos vegetales han obtenido positivos resultados, es así que Kiran y Patra (2003) utilizando el extracto vegetal de *Mentha arvensis* L. obtuvieron reducciones en la tasa de nitrificación de 40 %.

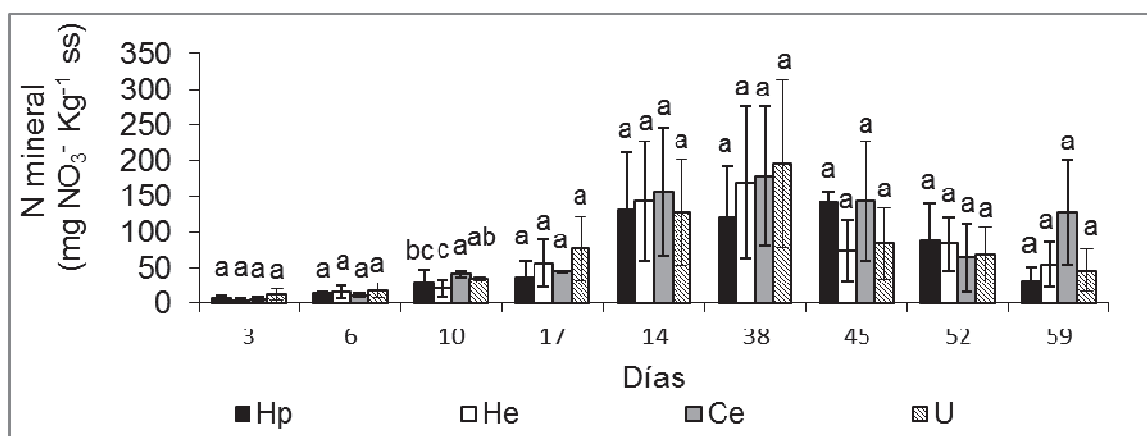
Suelo Andisol. Para el caso de las transformaciones de N mineral en el suelo Andisol (Figura 6), se aprecia que tampoco es posible evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos ni el control en ninguna de las fechas evaluadas durante el experimento.

Figura 6. Contenido de amonio en suelo Andisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).



En cuanto a la producción de nitrato en el suelo mediado por aplicaciones de los tratamientos (Figura 7), se puede observar las variaciones de los contenidos de N disponible en el suelo; sin embargo no hay diferencia entre los tratamientos y el control.

Figura 7. Contenido de nitrato en suelo Andisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).



Biomasa Microbiana del suelo

En la Figura 8, es posible observar que las variaciones en cuanto a biomasa microbiana en el suelo Alfisol, son generadas en respuesta a las transformaciones del N en el suelo durante el tiempo transcurrido del experimento y no a la presencia de los extractos vegetales, debido a que las diferencias entre los tratamientos y el control son mínimas. Lo mismo ocurre para el suelo Andisol (Figura 9). Para este caso tampoco el DCD tuvo mayor efecto sobre la biomasa microbiana (Apéndice 2). Por lo tanto, los tratamientos no habrían tenido influencia sobre las poblaciones microbianas del suelo. Resultados diferentes de los postulados por O'Callaghan *et al.* (2010), quienes observaron un notorio efecto del DCD sobre las comunidades bacterianas responsables de la nitrificación, así como también con otros inhibidores comerciales como el acetileno (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2013).

Figura 8. Biomasa microbiana en suelo Alfisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

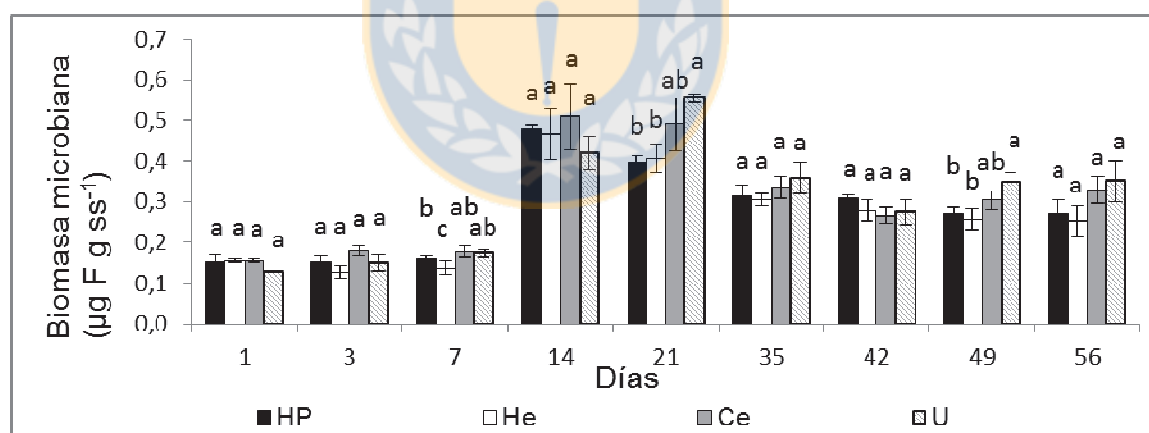
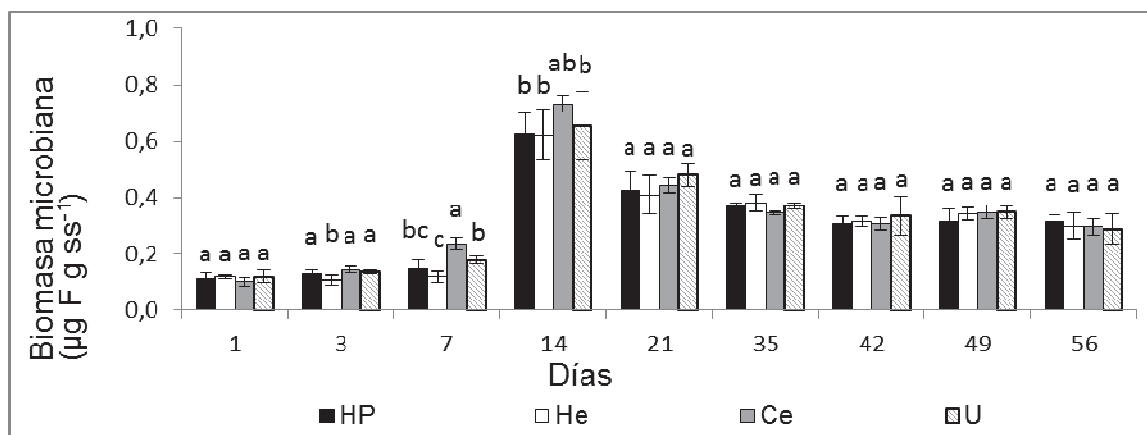


Figura 9. Biomasa microbiana en suelo Andisol con aplicaciones de extractos vegetales. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).



Discusión general de los resultados obtenidos en ensayo a nivel de campo

La evaluación de los tratamientos sobre las transformaciones del N de la urea hacia amonio y nitrato, realizado en el suelo Alfisol no mostró efecto con excepción del día 3 post fertilización pero que no tuvo continuidad en el tiempo. Al igual que el estudio realizado en el suelo Andisol no mostró diferencia significativa durante todo el periodo de evaluación.

La relación entre la inhibición sobre la nitrificación generada por los extractos vegetales y la capacidad de precipitar proteínas de los mismos, no pudo ser validada por el estudio en campo, dado que los extractos, independiente de su capacidad de precipitar proteínas, a nivel de invernadero no tuvieron una acción inhibitoria relevante para ser atribuida a la presencia de dichos compuestos. Por lo tanto, el efecto de los extractos aplicados en estado acuoso realizado por otros autores como Suescún *et al.*, (2012) y Medina (2011) no fue posible de evidenciar al someter a los extractos a esta nueva formulación utilizada en la presente investigación. La baja efectividad de los extractos podría ser atribuida a la tecnología utilizada en esta investigación para su aplicación en terreno, impidiendo evidenciar la relación entre la inhibición por parte de los extractos sobre procesos de nitrificación y actividad ureasa, como plantearía Suescún *et al.* (2012) y Mohanty *et al.* (2008), ni sobre la actividad microbiana en el suelo.

Basado en la efectividad de los extractos en la disminución de los procesos de nitrificación en el suelo, obtenidos por los autores que han sido nombrados anteriormente, es posible inferir que el proceso de liofilización, al que fueron sometidos los extractos en este estudio para hacer posible su aplicación en terreno como cobertura de los gránulos de urea, haya provocado una desactivación de los componentes activos de los extractos, inhabilitando así su capacidad inhibitoria. Ya que este proceso fue una variación importante respecto a los estudios previos.

Dado que no ha sido posible evidenciar en terreno el probado potencial de los extractos de inhibir el proceso de nitrificación en el suelo y los procesos biológicos antes mencionados, no fue posible relacionar estos factores con los elementos contenidos en sus estructuras ni con los resultados obtenidos en los estudios de modos de acción. Por lo que fue necesario contrastar los resultados obtenidos en campo con un ensayo llevado a cabo a nivel de laboratorio con condiciones controladas.

Ratificación del efecto de los extractos en el proceso de mineralización de N

Las Figuras 10 y 11 muestran la transformación de N desde urea hacia N mineral a 3 dosis de aplicación durante 14 días de incubación bajo condiciones controladas. Es posible ratificar que los datos obtenidos como resultado de la experiencia que se llevó a cabo en invernadero con el mismo suelo (Figuras 6 y 7) con los obtenidos en laboratorio son similares. Confirmando así, que la acción de los extractos sobre los procesos de nitrificación, no es efectiva mediante la tecnología utilizada en este experimento.

Figura 10. Contenido de amonio en condiciones de laboratorio, incubado por 14 días. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).

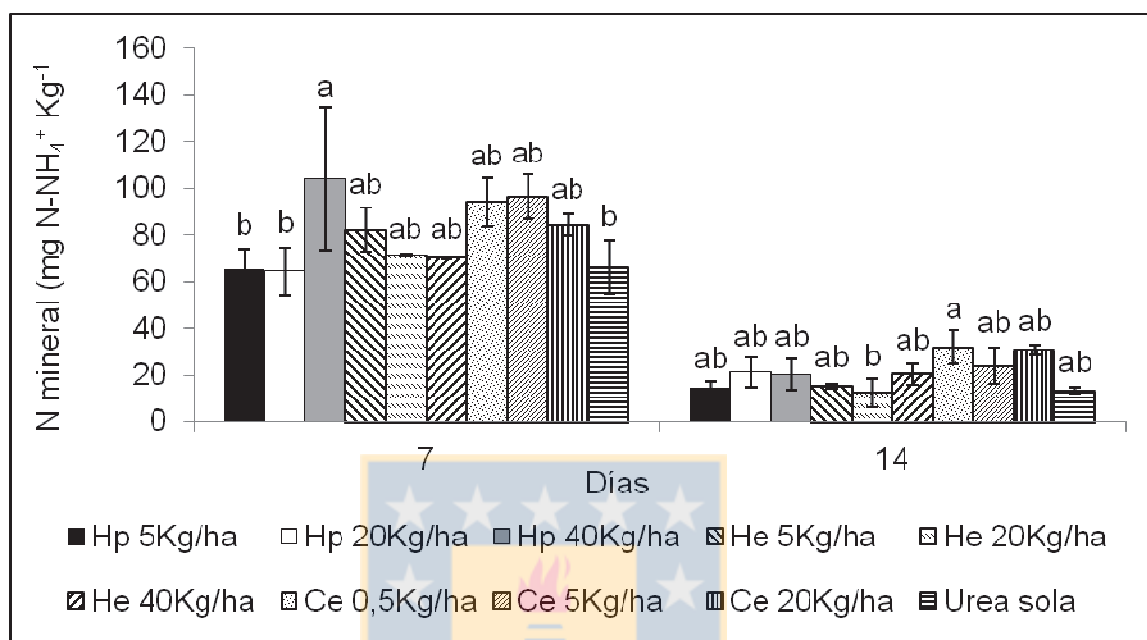
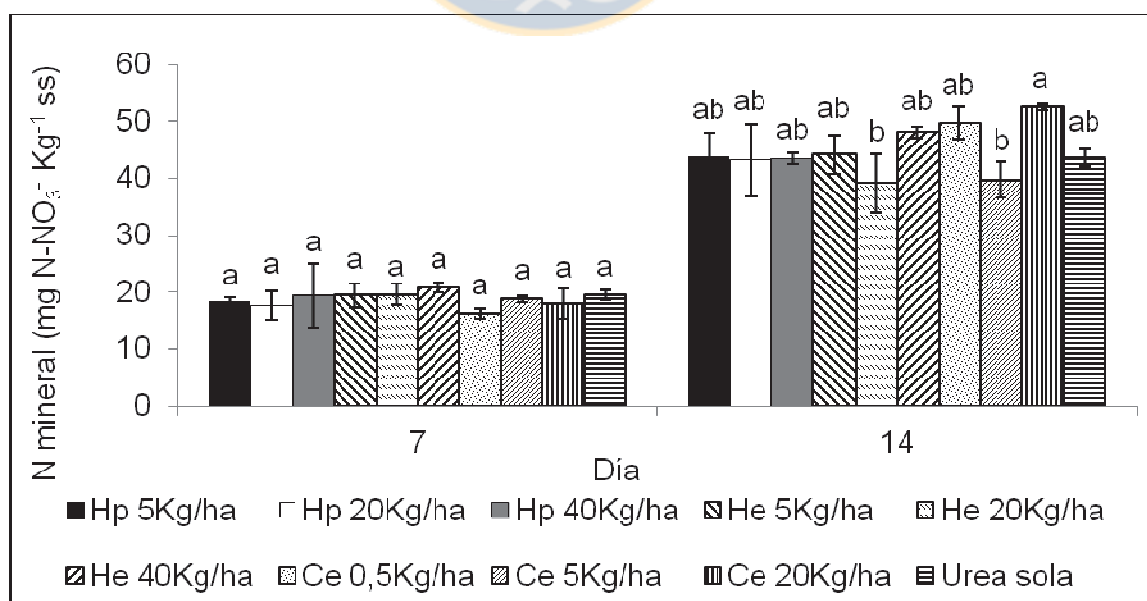


Figura 11. Contenido de nitrato en condiciones de laboratorio, incubado por 14 días. Hp: Hoja de Peumo; He: Hoja de Eucalipto; Ce: Corteza de Eucalipto; U: Urea. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Test de Duncan, $P \leq 0,05$).



Con los datos presentados en las Figuras 10 y 11, fue posible ratificar que los resultados obtenidos en terreno no fueron alterados por algún factor que no haya sido considerado en el estudio, sino que la tecnología utilizada para la aplicación del fertilizante con los extractos, no surtió el efecto esperado, mantener activa la capacidad de los extractos de inhibir la nitrificación en el suelo. Lo que sugiere que otra formulación que haya dado buenos resultados debiera ser utilizada para lograr el efecto inhibitorio deseado. Tal es el caso de la técnica, antes mencionada, con biocarbón, con la que se ha logrado reducir en un 30% la producción de nitrato (Quilodrán, 2013).

CONCLUSIÓN

Los modos de acción de los extractos vegetales evaluados en este estudio, demuestran ser diversos, tal es el caso que extractos vegetales procedentes de hoja y corteza de peumo (Hp, Cp) y corteza de eucalipto (Ce) los cuales produjeron disminuciones en las poblaciones de bacterias oxidantes del amonio. Sin embargo, los extractos procedentes de Ce, Cp y corteza de acacia (Ca) presentaron mayor inhibición de la actividad de la enzima ureasa. No hubo una relación entre la capacidad inhibitoria tanto a nivel de bacterias nitrificantes ni actividad enzimática con su contenido de proantocianidinas ni el grado de polimerización de las moléculas orgánicas contenidas en los extractos vegetales.

La técnica de recubrimiento de fertilizante con los extractos vegetales aquí evaluados no resultó ser una alternativa biotecnológica viable, dado que el potencial de los extractos de actuar como inhibidores no fue expresado.

REFERENCIAS

1. Adamczyk, A., O. Kiikkilä, V. Kitunen and A. Smolander. 2013. Potential response of soil processes to diterpenes, triterpenes and tannins: Nitrification, growth of microorganisms and precipitation of proteins. *Applied Soil Ecology* 67: 47-52.
2. Alef, 1995. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. En: Alef and Nannipieri (1995) (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, London, pp. 232-233.

3. Bhatia, A., S. Sasmal, N. Jain, H. Pathak, R. Kumar and A. Singh. 2010. Mitigating nitrous oxide emission from soil under conventional and no-tillage in wheat using nitrification inhibitors. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 136(3-4): 247-253.
4. Campbell, N.E.R., and M.I.H. Aleem. 1965. The effect of 2-chloro, 6-(trichloromethyl) pyridine on the chemoautotrophic metabolism of nitrifying bacteria: II. Nitrite oxidation by *Nitrobacter*. *Antonie van Leeuwenhoek* 31:137-144.
5. Cervantes-Carrillo, F., J. Pérez, J. Gómez. 2000. Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:73-82.
6. Chávez, F., M. Aranda, A. García, E. Pastene. 2011. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(3): 265-280.
7. Chen, D., H.C. Suter, A. Islam, R. Edis. 2010. Influence of nitrification inhibitors on nitrification and nitrous oxide (N₂O) emission from a clay loam soil fertilized with urea. *Soil Biology & Biochemistry* 42:660-664.
8. Cole, C.V., J. Duxbury, J. Freney, O. Heinemeyer, K. Minami, A. Mosier, K. Paustian, N. Rosenberg, N. Sampson, D. Sauerbeck and Q. Zhao. 1997. Global estimates of potential mitigation of greenhouse gas emissions by agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 49: 221–228.
9. Feng, R., T. Wang, W. Wei, R.X. Tan and H.M. Ge. 2013. Cytotoxic constituents from *Cryptocarya maclurei*. *Phytochemistry* 90:147-153.
10. Gianfreda, L., M.A. Rao and A. Violante. 1995. Formation and activity of urease-tannate complexes affected by aluminum, iron, and manganese. *Soil Science Society of America journal* 59(3):805-810.
11. Green, V., D. Stott and M. Diack. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38(4):693-701.
12. Greenwood, D.J., K. Kubo, I.G. Burns and A. Draycott. 1989. Apparent recovery of fertilizer N by vegetable crops. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 35(3): 367-381.

13. Han, X., S. Chen and X. Hu. 2009. Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating. *Desalination* 240:21-26.
14. Hedley, C.B., S. Saggiar and K.R. Tate. 2006. Procedure for fast simultaneous analysis of the greenhouse gases: methane, carbon dioxide, and nitrous oxide in air samples. *Commun. Soil Science Plant Analysis* 37(11-12): 1501-1510.
15. Hua, L., L. Xinqiang, C. Yingxu, L. Yanfeng. 2008. Effect of nitrification inhibitor DMPP on nitrogen leaching, nitrifying organisms, and enzyme activities in a rice-oilseed rape cropping system. *Journal of Environmental Sciences* 20: 149–155.
16. Kiran, U. and D.D. Patra. 2003. Medicinal and aromatic plant materials as nitrification inhibitors for augmenting yield and nitrogen uptake of Japanese mint (*Mentha arvensis* L. Var. *Piperascens*). *Bioresource Technology* 86:267–276.
17. Ladd, J.N. and R.B. Jackson. 1982. Biochemistry of ammonification. Division of Soils, CSIRO, Glen Osmond, South Australia, Australia 173-228.
18. Lata, J.C., V. Degrange, X. Raynaud, P.A. Maron, R. Lensi and L. Abbadie. 2004. Grass populations control nitrification in savanna soils. *Functional Ecology* 18:605-611.
19. Lehtovirta-Morley, L.E. D.T. Verhamme, G.W. Nicol and J.I. Prosser. 2013. Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of *Nitrosotalea devanattera* in culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 62: 129–133.
20. Longeri, L., J. Etchevers y J. Venegas. 1979. Metodología de perfusión para estudios de nitrificación en suelos. *Ciencia e Investigación Agraria* 6(4): 295-299.
21. Lotito, S.B., L. Actis-Goretta, M.L. Renart, M. Caligiuri, D. Rein, H.H. Schmitz, F.M. Steinberg, C.L. Keen and C.G. Fraga. 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 945–951.

22. Macadam, X.M.B., A. del Prado, P. Merino, J. M. Estavillo, M. Pinto, and C. González-Murua. 2003. Dicyandiamide and 3,4-dimethyl pyrazole phosphate decrease N₂O emissions from grassland but dicyandiamide produces deleterious effects in clover. *Journal Plant Physiology* 160:1517–1523.
23. Majumdar, D. 2002. Suppression of nitrification and N₂O emission by karanjin—a nitrification inhibitor prepared from karanja (*Pongamia glabra* Vent.). *Chemosphere* 47:845–850.
24. Majumdar, D. 2008. Unexploited botanical nitrification inhibitors prepared from karanja plant. *Natural Product Radiance* 7(1):58-67.
25. McCarty, G.W., J.M. Bremner and E.L. Schmidt. 1991. Effects of phenolic acids on ammonia oxidation by terrestrial autotrophic nitrifying microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 85(4):345–349.
26. McCarty, G.W. 1999. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils* 29:1–9.
27. McGuinn, A.F. 1924. The action of dicyandiamide and guanyl urea sulfate on plant growth. *Soil Science* 17:487–500.
28. McGinn S.M. 2005. Measuring greenhouse gas emissions from point sources in agriculture. *Canadian Journal of Soil Science* 86:355-371.
29. Medina, N. 2011. Inhibición de los procesos biológicos precursores de las emisiones de óxido nitroso mediante el uso de extractos vegetales. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
30. Mohanty, S., A.K. Patra and P.K. Chhonkar. 2008. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel powder retards urease and nitrification activities in different soils at contrasting moisture and temperature regimes. *Bioresource Technology* 99:894–899.
31. Murillo, E. y J. Méndez. 2007. Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Ibagué, Colombia.

32. O'Callaghan M., E.M. Gerard, P.E. Carter, R. Lardner, U. Sarathchandra, G. Burch, A. Ghani, N. Bell. 2010. Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1425-1436.
33. Paavolainen L., V. Kitunen, and A. Smolander. 1998. Inhibition of nitrification in forest soil by monoterpenes. *Plant and Soil* 205:147–154.
34. Patra, D.D., M. Anwar, S. Chand, U. Kiran, D. K. Rajput, S. Kumar. 2002. Nimin and Mentha spicata oil as nitrification inhibitors for optimum yield of Japanese mint. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33(3-4):451–460.
35. Quilodrán, C. 2013. Evaluación de inhibidores naturales de la nitrificación formulados con una matriz de biocarbón. Tesis Magíster en Ciencias Agronómicas. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
36. Rice, E.L., and S.K. Pancholy. 1973. Inhibition of nitrification by climax ecosystems II. additional evidence and possible role of tannins. *American Journal of Botany* 60(7):691-702.
37. Rice, E.L., and S.K. Pancholy. 1974. Inhibition of nitrification by climax ecosystems III. inhibitors other than tannins. *American Journal of Botany* 61(10):1095-1103.
38. Robarge, W., A. Edwards and B. Johnson. 1983. Water and waste water analysis for nitrate via nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 14(12):1207-1215.
39. Schmidt, E.L. and L.W. Belser. 1994. Nitrifying bacteria p.159-177. In R.W. Weaver (ed.) *Methods of soil analysis: Microbiological and biochemical properties*. 3rd Ed. Soil Science Society of America, Madison, WI.
40. Shoji, S, J. Delgado, A. Mosier and Y. Miura. 2001. Use of controlled release fertilizers and nitrification inhibitors to increase nitrogen use efficiency and to conserve air and water quality. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32(7-8):1051–1070.

41. Singh, J., A. Kunhikrishnan, N.S. Bolan and S. Saggar. 2013. Impact of urease inhibitor on ammonia and nitrous oxide emissions from temperate pasture soil cores receiving urea fertilizer and cattle urine. *Science of the Total Environment* 465:56–63.
42. Singh, S.N., and A. Verma. 2007. The potential of nitrification inhibitors to manage the pollution effect of nitrogen fertilizer in agricultural and other soils: A review. *Environmental Practice* 9(4):266-279.
43. Sivropoulou, A., S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2384-2388.
44. Suescún, F., L. Paulino, E. Zagal, C. Ovalle, and C. Muñoz. 2012. Plant extracts from the Mediterranean zone of Chile potentially affect soil microbial activity related to N transformations: a laboratory experiment. *Acta Agricultaræ Scandinavica, Section B* 62:556-564.
45. Stolpe N. B. 2006. *Descripciones de los principales suelos de la VIII Región de Chile*. Publicaciones Universidad de Concepción. Departamento de Suelos y Recursos Naturales 84 pp.
46. Tan, K.H. 1996. Soil sampling preparation, and analysis – pp.138-153. *Books in Soils, Plants, and the Environment*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY. USA.
47. Tisdale, S.L., W.L. Nelson, J.D. Beaton and J.L. Halvin. 1993. *Soil Fertility and Fertilizers Fifth Edition* 648 pp.
48. Toselli, M., E. Baldi, G. Sorrenti, M. Quartieri and B. Marangoni. 2010. Evaluation of the effectiveness of soil-applied plant derivatives of Meliaceae species on nitrogen availability to peach trees. *Scientia Horticulturae* 124:183–188.
49. Trenkel, M. E. 1997. Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. International Fertilizer Industry Association Paris, France.
50. Ussiri, D.A.N., R. Lal and M.K. Jarecki. 2009. Nitrous oxide and methane emissions from long-term tillage under a continuous corn cropping system in Ohio. *Soil and Tillage Research* 104(2):247-255.

51. Yasmeen, R., A.S. Hashmi, A.A. Anjum, S. Saeed and K. Muhammad. 2012. Antibacterial activity of indigenous herbal extracts against urease producing bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 22(2):416-419.
52. Yan, J., G. Quan and C. Ding. 2013. Effects of the combined pollution of lead and cadmium on soil urease activity and nitrification. *Procedia Environmental Sciences* 18:78–83.
53. Zaman, M., S. Saggar, J.D. Blennerhassett and J. Singh. 2009. Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system. *Soil Biology & Biochemistry* 41:1270–1280.



APÉNDICES

Apéndice 1. Transformación de N mineral con aplicaciones de DCD (mg N-[NH₄⁺ ó NO₃⁻] g ss⁻¹). Promedio de 3 repeticiones.

Días	3	6	10	17	24	38	45	52	59
Alfisol									
NH ₄	136	217	357	204	159	153	156	121	105
NO ₃	7	17	41	27	39	23	23	135	6
Andisol									
NH ₄	145	281	432	338	313	300	127	168	93
NO ₃	7	21	18	32	54	107	74	135	57

Apéndice 2. Biomasa microbiana (µg F g ss⁻¹). Promedio de 3 repeticiones.

Días	3	6	10	17	24	38	45	52	59
Alfisol	0,164	0,147	0,149	0,431	0,475	0,381	0,306	0,297	0,315
Andisol	0,125	0,138	0,151	0,750	0,464	0,376	0,371	0,342	0,334

Apéndice 3. Porcentaje de N recuperado de las plántulas de lechuga en suelo Andisol. Promedio de 3 repeticiones.

Repeticón	1	2	3
% N recuperado	8,20	6,66	7,91