



*Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados*



---

**IMPACTO DE LA APLICACIÓN PROLONGADA DE  
UREA SOBRE LA COMUNIDAD DE BACTERIAS  
OXIDANTES DEL AMONÍACO EN UN SUELO  
ARGIUDOL TÍPICO DE ARGENTINA**

**Mónica F. Boccolini**

**Tesis**

**Para optar al Grado Académico de  
Magister en Ciencias Agropecuarias**

**Mención: Recursos Naturales**

***Córdoba, 2016***

**IMPACTO DE LA APLICACIÓN PROLONGADA DE UREA SOBRE LA  
COMUNIDAD DE BACTERIAS OXIDANTES DEL AMONÍACO EN UN SUELO  
ARGIUDOL TÍPICO DE ARGENTINA**

**Mónica F. Boccolini**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Dra. Eva Lucía M. Figuerola

**Asesores:** Dra. María Basanta

Prof. Cs. Biol. (Mgter.) Laura Ester Torres

**Tribunal Examinador de Tesis**

**Dra. Silvina Vargas Gil** .....

**Dra. María Basanta** .....

**Dr. Jorge Angelini** .....

**Presentación formal académica**

**18 de Noviembre de 2016  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad Nacional de Córdoba**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios que todo lo contempla, por todo lo que me ha dado.

A mi directora Eva y asesoras Laura y María, por dedicarme su tiempo y ayuda desde lo profesional y humano.

A mis compañeros de trabajo Carlos, Tomás, Claudio, Vanesa, Bethania, Jimena y Domingo por su constante aliento, apoyo y ayuda incondicional.

A mis padres Víctor y Adriana por enseñarse desde pequeña a valorar el estudio y su importancia; a mis hermanos Valeria y Ariel por alentarme y estar siempre presentes.

A mi esposo Cristian y a mis hijos Leandro, Lucía y Rocío por ser mi inspiración y fuerza día a día, porque supieron aguantar mis ausencias y por darme su constante amor y apoyo.

## **DEDICATORIA**

*A mis hijos que son el motor y razón de mi vida  
A mi esposo por todo lo que significas  
A mis padres por lo que soy  
A los que ya no están a mi lado pero siguen estando presentes*

*"Si puedes encontrar un camino sin obstáculos, es probable que no lleve  
a ninguna parte".*

**Frank A. Clark**

## RESUMEN

La oxidación del amoníaco a nitrito constituye un paso crítico en el ciclo del nitrógeno (N) y es realizado por las bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) o Nitritantes. El manejo agrícola puede afectar la comunidad de las BOA a través del uso prolongado de fertilizantes nitrogenados como la urea, cuya aplicación tiende a aumentar la acidez del suelo. El objetivo de este estudio fue caracterizar la comunidad de las BOA bajo el efecto acumulado de la aplicación de urea luego de 12 años en una secuencia maíz – trigo/soja – soja en siembra directa. El ensayo presenta un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones sobre un suelo Argiudol típico de Marcos Juárez, Sudeste de Córdoba, Argentina. Los tratamientos fueron: A control sin aplicación; B y C con 95 y 165 kg ha<sup>-1</sup> de urea como fuente de N, respectivamente. Se realizaron dos muestreos: previo a la siembra y en postcosecha de maíz. Para la caracterización de la comunidad de BOA se utilizaron los métodos del número más probable, *shaken soil slurry*, reacción en cadena de la polimerasa y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante. Además se determinaron variables químicas de suelo. La fertilización con urea disminuyó el pH del suelo, aumentó la abundancia y diversidad de las BOA pero no produjo cambios significativos en la actividad nitrificante potencial. La estructura de la comunidad de las bacterias nitritantes estuvo dominada por miembros del Grupo 3 de *Nitrosospira* en todos los tratamientos. Los resultados obtenidos indican que la fertilización con urea a largo plazo en un Argiudol típico representó una fuente de sustrato más que un factor limitante para las BOA. El efecto de la fertilización sobre la estructura de la comunidad de BOA fue más evidente en el muestreo previo a la siembra de maíz.

**Palabras claves:** Nitrógeno - Fertilización - Nitritantes

## ABSTRACT

Ammonia oxidation to nitrite is a critical step in the nitrogen (N) cycle and is performed by ammonia oxidizing bacteria (AOB) or Nitritants. The agricultural management can affect the AOB community due to the prolonged use of nitrogen fertilizers such as urea which tends to increase soil acidity. The aim of this work was characterize AOB community after 12 years of urea application in a corn – wheat/soybean-soybean cropping sequence under no-tillage practices. The field experiment was performed a randomized complete block design with three replicates on a typical Argiudol soil at Marcos Juárez, Southeast of Córdoba, Argentine. The treatments were: A Unfertilized control; B and C with 95 and 165 kg ha<sup>-1</sup> of urea as N source respectively. Soil samples were collected before sowing and after harvest of corn. The community of AOB was studied through the most probable number method, shaken soil slurry, polymerase chain reaction and electrophoresis in denaturing gradient gel. Also, soil chemical variables were determined. Urea fertilization decreased soil pH, increased the abundance and diversity of the AOB but did not significantly affect the nitrification potential. The structure of nitritants bacteria community was dominated by members of the Group 3 of *Nitrosospira* in all the treatments. The results showed that long-term urea fertilization in a typical Argiudol was a source of substrate and not a limiting factor for the nitritant bacteria. The fertilization effect on the community structure of ammonia oxidizers was more evident for the sampling date before corn sowing.

**Key words:** Nitrogen - Fertilization - Nitritants

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Ciclo del nitrógeno con énfasis en el proceso de Nitrificación del suelo .....	1
Factores que regulan el proceso de Nitrificación en el suelo .....	5
Población nitrificante .....	6
Acidez .....	6
Aireación y contenido de agua.....	7
Temperatura .....	7
Estación del año .....	8
Contenido de materia orgánica del suelo y rastrojos de cultivo .....	8
Diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco en el suelo: utilización de marcadores de ARN ribosomal.....	10
Filogenia de las bacterias oxidantes del amoníaco .....	13
Consumo de fertilizantes .....	14
Fertilizantes nitrogenados .....	15
La urea como fertilizante nitrogenado .....	16
Factores que condicionan el efecto de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados en el suelo.....	17
Manejo de fertilización .....	17
Condiciones de suelo .....	18
Antecedentes de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados sobre la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco .....	18
Manejo agrícola en la zona de estudio.....	20
Problemática .....	21
Hipótesis .....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos .....	22
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
Descripción del área de estudio .....	23
Ensayo y diseño experimental .....	24
Muestreo de suelo y rastrojos .....	27
Acondicionamiento de las muestras .....	27
Determinaciones químicas .....	28

Contenido de nitrógeno inorgánico del suelo .....	28
Acidez de suelo .....	29
Materia orgánica total y nitrógeno total .....	30
Materia orgánica particulada y nitrógeno particulado .....	32
Rastrojos y aporte de carbono y nitrógeno .....	33
Determinaciones microbiológicas .....	33
Recuento de bacterias oxidantes del amoníaco .....	33
Actividad nitrificante potencial .....	34
Nitrógeno potencialmente mineralizable .....	35
Extracción de ADN genómico .....	36
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	36
Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) .....	38
Preparación de geles y condiciones de electroforesis .....	38
Análisis de la estructura y diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco .....	39
Análisis de imágenes y agrupamiento .....	39
Determinación de la diversidad .....	40
Secuenciación y análisis filogenético .....	41
Análisis estadístico de los datos .....	41
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
Propiedades químicas de rastrojos y suelo .....	43
Fuentes de nitrógeno orgánico y disponibilidad .....	43
Acidez y contenido de nitrógeno inorgánico .....	43
Caracterización de la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco bajo los diferentes tratamientos de fertilización .....	47
Abundancia, actividad y diversidad .....	47
Relaciones entre la comunidad de oxidantes de amoníaco y las propiedades químicas del suelo .....	48
Estructura de la comunidad .....	50
Búsqueda de secuencias y árbol filogenético .....	53
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
Efecto de la aplicación de urea sobre los rastrojos de cosecha y aporte de nitrógeno .....	57
Efecto sobre la materia orgánica del suelo, su fracción particulada y disponibilidad de nitrógeno .....	58
Efecto sobre la acidez del suelo .....	60



Efecto sobre los contenidos de amoníaco y nitrato del suelo .....	60
Efecto sobre la abundancia, actividad y diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco.....	61
Efecto sobre la estructura de la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco.....	64
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Tipos de fertilizantes nitrogenados y su contenido de N. ....	<b>16</b>
<b>Tabla 2.1</b> Dosis de N aplicadas en el ensayo en cada cultivo para cada tratamiento. ...	<b>26</b>
<b>Tabla 2.2</b> <i>Primers</i> de genes ribosomales 16S utilizados.....	<b>38</b>
<b>Tabla 3.1</b> Cantidad y calidad de rastrojos de cosecha, materia orgánica y nitrógeno anaeróbico del suelo bajo los tratamientos de fertilización estudiados y situación de referencia. ....	<b>45</b>
<b>Tabla 3.2</b> Acidez, contenidos de nitrógeno de nitrato y de amonio del suelo bajo los tratamientos de fertilización estudiados y situación de referencia. ....	<b>46</b>
<b>Tabla 3.3</b> Valores de abundancia, diversidad ( $H'$ ) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) y Potencial de nitrificación de suelo (PNS) en los tratamientos de fertilización estudiados y situación de referencia. ....	<b>47</b>
<b>Tabla 3.4</b> Matriz de correlación de Pearson entre abundancia y diversidad ( $H'$ ) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA), Potencial de nitrificación de suelo (PNS) con los rastrojos y propiedades químicas, en un primer muestreo (presiembr a de maíz) y segundo (postcosecha). ....	<b>49</b>
<b>Tabla 3.5</b> Bandas de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) recortadas a partir de la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), secuencias conocidas de mayor similitud en el Gen Bank, porcentaje de similitud y origen de las mismas. ....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.1** Ciclo del N en Agroecosistemas.. ..... **1**
- Fig. 1.2** Representación esquemática de la filogenia de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) autotróficas en a base secuencias de genes ADNr 16S. .... **14**
- Fig. 2.1** Condiciones climáticas dadas en la zona de estudio y período estudiado desde octubre 2010 a junio 2011. .... **24**
- Fig. 2.2** Esquema representativo del diseño del experimento en el ensayo con los tratamientos seleccionados en la campaña 2010-2011. .... **25**
- Fig. 2.3** Vista general del ensayo de larga duración y la pastura natural adyacente (A). Parcela del ensayo de larga duración bajo el tratamiento de mayor dosis de fertilización con rastrojos de maíz, Junio del 2011 (B). .... **27**
- Fig. 3.1** Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) en un primer muestreo para los diferentes tratamientos de fertilización estudiados y situación de referencia (A); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson) expresado en porcentaje (B). .... **51**
- Figura 3.2** Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) en un segundo muestreo para los diferentes tratamientos de fertilización estudiados y situación de referencia (A); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson) expresado en porcentaje (B). .... **52**
- Fig. 3.3** Árbol filogenético de las secuencias parciales del ADNr 16S de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA), correspondientes a las bandas seleccionadas a partir de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y las secuencias con mayor similitud obtenidas de GenBank. .... **55**

## LISTA DE ABREVIACIONES Y/O SÍMBOLOS

- A:** Maíz sin Fertilización
- AC:** Análisis de Conglomerados
- ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- AHO:** Enzima Hidroxilamina Oxidoreductasa
- AMO:** Enzima Amoniomonooxidasa
- AOA:** Archaea Oxidantes del Amoníaco
- ARNr 16S:** Ácido Ribonucleico Ribosómico 16S
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- B:** Maíz con 90 kg. N ha<sup>-1</sup> (fertilización uso actual del productor)
- BOA:** Bacterias Oxidantes del Amoníaco
- BON:** Bacterias Oxidantes del Nitrito
- C/N:** Relación Carbono-Nitrógeno
- C:** Carbono
- C:** Maíz con 165 kg. N ha<sup>-1</sup> (fertilización de reposición)
- CAN:** Nitrato de Amonio Calcáreo
- CIC:** Capacidad de Intercambio Catiónico
- CO:** Carbono Orgánico
- CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono
- COS:** Carbono Orgánico del Suelo
- COT:** Carbono Orgánico Total
- DAP:** Fosfato Diamónico
- DGGE:** Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante
- H<sup>+</sup>:** Ión Protón
- H<sub>2</sub>O:** Agua
- INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- IRAM:** Instituto Argentino de Normalización y Certificación
- K:** Potasio
- MAP:** Fosfato Monoamónico
- MinAgri:** Ministerio de Agricultura
- MOJ:** Materia Orgánica Joven

**MOL:** Materia Orgánica Lábil  
**MOP:** Materia Orgánica Particulada  
**MOS:** Materia Orgánica del Suelo  
**N:** Nitrógeno  
**N<sub>0</sub>:** Nitrógeno Potencialmente Mineralizable  
**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno Atmosférico  
**N<sub>2</sub>O:** Óxido Nitroso  
**NA:** Nitrato de Amonio  
**Nan:** Nitrógeno Anaeróbico  
**NH<sub>3</sub>:** Amoníaco  
**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** Amonio  
**NMP:** Número Más Probable  
**NO:** Óxido de Nítrico  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrito  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Nitrato  
**NOS:** Nitrógeno Orgánico del Suelo  
**NT:** Nitrógeno Total  
**O<sub>2</sub>:** Oxígeno  
**P:** Fósforo  
**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa  
**pH:** Potencial Hidrógeno  
**PNS:** Potencial de Nitrificación de Suelo  
**SA:** Sulfato de Amonio  
**SD:** Siembra Directa  
**SR:** Situación de Referencia  
**T:** Tratamiento  
**UAN:** Urea-Nitrato de Amonio

INTRODUCCIÓN

**Ciclo del nitrógeno con énfasis en el proceso de Nitrificación del suelo**

El nitrógeno (N) es la unidad clave de las moléculas de proteínas sobre la cuales se basa la vida, siendo un componente esencial de plantas, animales y microorganismos (Ciarlo y Plama, 2011). Por sus funciones en la fisiología de las plantas constituye un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Ruiz Rueda, 2008).

En la naturaleza, el N es uno de los elementos más ampliamente distribuidos y existe en varios estados de oxidación, como gases, iones y en la materia orgánica del suelo (MOS). Las conversiones entre estas formas son en su mayoría llevadas a cabo por microorganismos, constituyendo uno de los ciclos biogeoquímicos más complejos donde están involucradas reacciones metabólicas importantes como fijación del N, amonificación, nitrificación y desnitrificación (Ruiz Rueda, 2008).

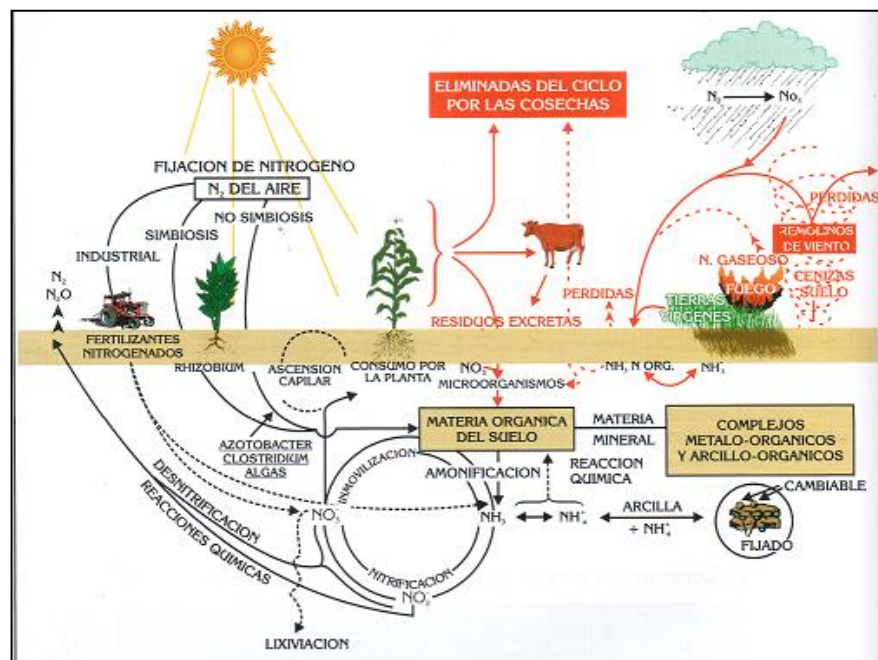


Fig. 1.1 Ciclo del N en Agroecosistemas. Adaptado de Stevenson (1982).

El ciclo de N comprende diversas transformaciones que ocurren en forma simultánea y en sentido opuesto (Fig. 1.1), involucrando formas orgánicas e inorgánicas (algunas volátiles). Aunque la atmósfera representa la fuente primaria de N para el suelo (79,8 % en volumen), las moléculas de N atmosférico ( $N_2$ ) no pueden ser tomadas directamente por las plantas y los animales, sin antes ser fijadas (Frioni, 2006; Ciarlo y Palma, 2011).

La fijación de N puede ocurrir biológicamente a través de diversos microorganismos fijadores simbióticos o de vida libre, donde el  $N_2$  es reducido a amoníaco ( $NH_3$ ) e incorporado al metabolismo microbiano para producir aminoácidos y sintetizar sus propias proteínas (Ciarlo y Palma, 2011). También la fijación se puede dar a través de fenómenos ocurridos en la atmósfera mediante descargas eléctricas, y por la actividad antrópica a través de la industria de fertilizantes (Madigan *et al.*, 2004). Otras incorporaciones de N al suelo son a través de excretas animales y por residuos de cultivos (Ciarlo y Palma, 2011).

La amonificación constituye el primer paso en la mineralización del ciclo del N y es realizada por microorganismos heterótrofos (Stevenson, 1985). Es el proceso mediante el cual los compuestos nitrogenados de los tejidos de los organismos y de la MOS se descomponen y producen como producto final, el  $NH_3$ , que en la solución de suelo se encuentra protonado como ion amonio ( $NH_4^+$ ) y puede participar de múltiples vías metabólicas, entre ellas ser la fuente de sustrato de diversos microorganismos (Ciarlo y Palma, 2011).

La nitrificación es el proceso final de la mineralización de la MOS (Orozco, 1999) donde ocurre la oxidación biológica del  $NH_3$  a nitrato ( $NO_3^-$ ). La misma, puede ser llevada a cabo por un amplio rango de microorganismos heterótrofos y autótrofos, aunque es mucho más importante la participación de este último grupo, ya que se considera que la nitrificación heterotrófica está limitada generalmente a suelos ácidos o suelos de bosque ricos en material orgánico (Kurola, 2006).

Si bien investigaciones recientes han demostrado la presencia de nitrificación heterotrófica en suelos agrícolas sometidos a fertilización, otros estudios Madigan *et al.*

(2004); Sylvia *et al.* (2005) y Mc. Neill and Unkovich (2007), coinciden en que la nitrificación autotrófica es la predominante en suelos agrícolas.

Estudios recientes han destacado el rol de las Archaea oxidantes del amoníaco (AOA) en la nitrificación autotrófica como indicadoras y por su predominancia en suelos agrícolas con respecto a las bacterias oxidantes del amoníaco BOA (He *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). Sin embargo, ambos grupos difieren tanto en su fisiología como metabolismo lo que implica que distintos factores ambientales como pH, nutrientes nitrogenados de suelo, C orgánico y raíces de plantas puedan determinar la importancia funcional de cada grupo en ambientes naturales y especialmente en aquellos disturbados como los agroecosistemas (Ai *et al.*, 2013). Se ha reportado un mayor dominio y respuesta a las prácticas de manejo por parte de las BOA sobre las AOA en suelos cercanos a la neutralidad y alcalinos (Glaser *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2008); mientras que las AOA han sido predominantes en suelos muy ácidos (Zhang *et al.*, 2012).

Estos resultados indican que la predominancia de uno u otro grupo depende del tipo de suelo (Shen *et al.*, 2008). Un estudio realizado por Figuerola *et al.* (2010) en suelos de la región pampeana, observaron que aunque las AOA dominaban los suelos agrícolas, las BOA se mostraron más sensibles con una mayor proporción en aquellos campos sometidos a buenas prácticas de manejo. De acuerdo a los antecedentes planteados, surge la necesidad en este trabajo de estudiar a las bacterias nitrificantes autotróficas como las BOA, las que han sido propuestas como indicadoras de la calidad de suelo debido a que presentan mayor sensibilidad a grandes impactos y respuesta a cambios en el entorno en cortos períodos de tiempo; por lo tanto, son útiles como herramienta para medir impactos de manejo. Un cambio en la abundancia de estos organismos refleja la capacidad de producir nitrógeno disponible en los suelos (Roper y Ophel-Keller, 1998).

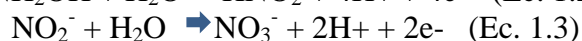
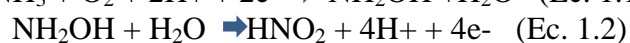
La nitrificación autotrófica puede impactar negativamente en algunos ambientes, principalmente en aquellos con altos niveles de deposición de N (Prosser, 1989). En los sistemas productivos agrícolas de regiones húmedas, el lavado de  $\text{NO}_3^-$  es a menudo el principal mecanismo de pérdida de N hacia los cursos de agua, contribuyendo a la



contaminación de la napa freática (Costa *et al.*, 2002). Sin embargo, la magnitud final del proceso de lavado de  $\text{NO}_3^-$  va a depender del suelo, clima y del manejo del cultivo (Echeverría y Sainz Rozas, 2006). Por otra parte, el proceso de nitrificación facilita el ciclado del N en los sistemas, ya que los  $\text{NO}_3^-$  representan la fuente de N para el proceso de desnitrificación que es la principal vía de eliminación del N fijado. En relación a esto, los microorganismos nitrificantes autotróficos como las BOA representan los componentes esenciales del ciclo del N (Calvó Perxas, 2005), debido a que la oxidación del amoníaco es el primer paso en la remoción del N desde su forma reducida a las oxidadas que estarán sujetas a pérdidas dentro del ambiente (Kowalchuk y Stephen, 2001).

Dos grupos funcionales autotróficos de acción secuencial catalizan el proceso de nitrificación autotrófica; las bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) o Nitritantes que utilizan preferentemente el  $\text{NH}_3$  como sustrato oxidándolo a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y las bacterias oxidantes del nitrito (BON) o Nitratantes que oxidan  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  (Kowalchuk y Stephen, 2001; Madigan *et al.*, 2004). En el primer paso de oxidación (Ec. 1.1), el  $\text{NH}_3$  que ingresa al citoplasma por difusión pasiva (Burton y Prosser, 2001) es oxidado a hidroxilamina a través de la enzima amoniomonooxidasa (AMO) ubicada en la membrana celular. Un átomo de oxígeno es incorporado al  $\text{NH}_3$  y el otro es reducido a agua. Esta reacción consume dos electrones que son derivados de la oxidación de la hidroxilamina a  $\text{NO}_2^-$  (Ec. 1.2) catalizada por la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) ubicada en el periplasma. En la misma, de los cuatro electrones generados, dos son usados por la enzima AMO, como se nombró y los restantes son utilizados en la formación de ATP o en la fijación de  $\text{CO}_2$  (Kurola, 2006). Las BOA están representadas por los géneros *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas* y *Nitrospira* (Bothe *et al.*, 2000).

Las BON participan del segundo paso de oxidación (Ec. 1.3) a través de la enzima nitrito-oxidoreductasa ( $\text{NO}_2\text{-OR}$ ). Durante este proceso, el átomo de  $\text{O}_2$  adicional del  $\text{NO}_3^-$  es derivado del agua (Aleem *et al.*, 1965). Los géneros más representativos de este grupo son *Nitrobacter*, *Nitrococcus* y *Nitrospina* (Forte, 2006).



Las BOA son probablemente el grupo más importante en el proceso de nitrificación, debido a que obtienen la energía para su crecimiento de la oxidación del amoníaco (Killham, 1990). Su principal fuente de carbono (C) es el  $\text{CO}_2$ , el cual es utilizado en el ciclo de Calvin. Por cada molécula de C fijada son necesarias 35 moléculas de  $\text{NH}_3$ , esto consume el 80% de la energía generada y explica la lenta tasa de crecimiento y menor producción celular de este grupo (Kurola, 2006).

Finalmente, el  $\text{NO}_3^-$  producido es reducido a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), óxido nítrico (NO) y  $\text{N}_2$  durante el proceso de desnitrificación (Madigan *et al.*, 2004). Intervienen numerosos microorganismos anaerobios que pueden utilizar  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones para obtener energía a partir de compuestos orgánicos (desnitrificación heterótrofa) cuando la tensión de oxígeno es baja (Forte, 2006). Además de las bacterias heterótrofas, también algunas quimioautotróficas pueden producir  $\text{N}_2\text{O}$  utilizando  $\text{NO}_3^-$  para la oxidación de compuestos inorgánicos tales como azufre y azufre (Golterman, 1991).

## **Factores que regulan el proceso de Nitrificación en el suelo**

Es conocido que una de las variables clave que afecta el proceso de nitrificación en los suelos es el contenido de  $\text{NH}_3$  (Kowalchuk y Stephen, 2001). La oxidación  $\text{NH}_3$  avanza más rápidamente que la recuperación por mineralización; es más inmovilizado que el  $\text{NO}_3^-$  por ser la fuente preferencial de N para los microorganismos (Frioni, 2006). El uso de fertilizantes agrícolas puede influenciar enormemente en la mineralización y por lo tanto, en la disponibilidad de  $\text{NH}_3$  en el suelo. Es así que, esta disponibilidad representa un factor principal que limita la nitrificación en la mayoría de los suelos (Skiba y Smith, 2000).

Otros factores clave que regulan la nitrificación son la abundancia de bacterias nitrificantes, pH, el suministro de  $\text{O}_2$ , contenido de agua, temperatura, estación del año, contenido de MOS, rastrojos de cultivo, disponibilidad de calcio y fosfatos, entre otros (Frioni, 2006; Ciarlo y Palma, 2011; Tisdale y Nelson, 1991).

## Población nitrificante

Debido a que la población de los microorganismos vive principalmente sobre la superficie de las partículas del suelo como arcilla y humus formando los agregados, la textura edáfica define el tamaño de las poblaciones microbianas, es por ello que, los suelos arcillosos soportan mayor cantidad de biomasa microbiana que los suelos franco-arenosos (Lacasta *et al.*, 2006). Como la cantidad de nitrificadores varía con el tipo de suelo (Echeverría y Sainz Rosas, 2015), los suelos aún con condiciones ambientales similares pueden diferir en su capacidad para nitrificar los compuestos amónicos añadidos (Tisdale y Nelson, 1991). Investigaciones realizadas en suelos Molisoles con diferentes texturas (Navarro *et al.*, 1980) han demostrado que independientemente del manejo, estos difieren en su capacidad de producir  $\text{NO}_3$  debido a diferencias en el tamaño de las poblaciones nitrificantes que se alojan en el complejo coloidal.

## Acidez

El óptimo crecimiento de cultivos puros de BOA en medio líquido se ha observado a un rango de pH entre 7.0 y 8.5 y típicamente no ocurre por debajo de un pH de 6.5 (Allison y Prosser, 1993).

La reacción neutra o alcalina del suelo favorece la nitrificación, ya que la producción de  $\text{NO}_2^-$  por *Nitrosomonas* sp. disminuye en forma rápida a medida que decrece el pH por debajo de 7,4; y el óptimo para *Nitrobacter* sp. oscila entre 6,6 y 7,4 (Ciarlo y Palma, 2011). En condiciones de acidificación, el  $\text{NH}_3$  se protoniza a  $\text{NH}_4^+$  y esta forma iónica no es compatible con la enzima AMO (Suzuki *et al.*, 1974) por lo que requiere transporte activo para su ingreso a la célula (Burton y Prosser, 2001). Sin embargo, se ha observado producción de  $\text{NO}_3^-$  en suelos ácidos con valores de pH potencial menores a 4 (Kowalchuk y Stephen, 2001).

Numerosas teorías han sido propuestas para explicar la tolerancia a la acidez del suelo por parte de las BOA como ciertas cepas de *Nitrospira* sp. AHB1. Algunas pueden ser la existencia de cepas acido-tolerantes, microsítios de pH relativamente neutro,

mantención del medio intracelular a un pH mayor y uso de actividad ureolítica como fuente de  $\text{NH}_3$  (Kowalchuk y Stephen, 2001; Burton y Prosser, 2001; Shen *et al.*, 2003). En este último mecanismo que se ha observado a valores de pH entre 4 y 7.5, la urea ingresa a la célula por difusión simple y es hidrolizada por la enzima ureasa intracelularmente a amoníaco (Burton y Prosser, 2001).

Diversos estudios a nivel molecular han detectado dominancia de distintos cluster de BOA en función de, además del manejo, de la acidez de suelo (Stephen *et al.*, 1996; Bruns *et al.*, 1999).

### Aireación y contenido de agua

La nitrificación es óptima en condiciones aerobias y requiere  $\text{O}_2$  como aceptor final de electrones (Bateman y Baggs, 2005). Por lo general, las BOA pueden adaptarse mejor a condiciones de bajo  $\text{O}_2$  que de baja concentración de amoníaco (Bothe *et al.*, 2000).

En condiciones anoxicas, *Nitrosomonas europaea* y *N. eutropha* y probablemente también otras BOA, pueden oxidar  $\text{NH}_3$  con  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{N}_2\text{O}$  como aceptores de electrones, pudiendo de esta manera desnitrificar (Schmidt y Bock, 1997). Las bacterias nitrificantes son más sensibles al exceso de humedad que a condiciones secas en el suelo (Tisdale y Nelson, 1991).

### Temperatura

La nitrificación ocurre entre los 5 y 40 °C, y su óptimo se considera a 25 °C en condiciones de zonas templadas y de 35 °C en clima tropical, de manera que la temperatura optima varía de acuerdo a la ubicación geográfica (Dalias *et al.*, 2002). No se conocen nitrificantes termófilos, por lo general, este proceso es afectado por las altas temperaturas (Ciarlo y Palma, 2011).

## Estación del año

El efecto de la estación está condicionado por la interacción de los factores nombrados anteriormente, principalmente por la humedad y temperatura (Echeverría y Sainz Rozas, 2006). No puede predecirse en que época del año el nivel de  $\text{NO}_3^-$  será mayor. En general, en la región templada la producción de  $\text{NO}_3^-$  es más activa en primavera y otoño, más lenta en verano e invierno. Pero las fluctuaciones de temperatura y humedad sumadas a las prácticas de manejo pueden alterar este comportamiento (Frioni, 2006). Numerosos estudios realizados en Molisoles de la región pampeana (Echeverría y Bergonzi, 1995; Sainz Rosas *et al.*, 1999) con distintos sistemas de manejo, detectaron que la mineralización del N durante el barbecho de cultivos de verano como el maíz, fue limitada durante los meses de julio a septiembre debido a las bajas temperaturas y disponibilidad hídrica, mientras que desde octubre a marzo, la nitrificación alcanzó el máximo potencial cuando la disponibilidad hídrica fue adecuada y las temperaturas más elevadas (García y Fabrizzi, 2001; Echeverría y Sainz Rozas, 2006).

## Contenido de materia orgánica del suelo y rastrojos de cultivo

La materia orgánica del suelo (MOS) o total (MOT) es un componente fundamental del mismo, del cual dependen muchas de sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Diovisalvi *et al.*, 2008). Está constituida por un 58% de carbono orgánico (CO) y concentra la mayor parte del N del suelo con un 5% de N total (Darwich, 2006).

Del N total del suelo en la capa arable, el N orgánico representa entre el 85 y 95% y el inorgánico que es la fracción disponible para las plantas, se encuentra en un porcentaje menor al 10%. (Darwich, 2006; Ciarlo y Palma, 2011). Uno de los procesos más importantes que afectan la disponibilidad de N en el suelo, es la mineralización de la MOS y de los rastrojos de cultivo (Cabrera, 2007; Murphy, 2015). Específicamente, la mineralización del N se relaciona principalmente con el tamaño de las fracciones de la MOS (Ros, 2012) y con el contenido de N o relación C/N de los rastrojos (Trinsoutrot *et al.*, 2000). Ros *et al.* (2011) observó en 98 suelos de historia agrícola con propiedades y

manejos contrastantes, que el 78% de la variación en la mineralización del N era explicada por el tamaño de las fracciones de MOS, mientras que un 8% era determinada por otras propiedades del suelo como textura y C/N de la MOS.

La MOS se encuentra constituida por una variedad importante de compuestos de complejidad variable en un continuo estado de transformación. En esta mezcla heterogénea de material orgánico no existen límites definidos. Sin embargo, conceptualmente, se pueden definir dos fracciones con características y propiedades muy diferentes: la fracción lábil compuesta por residuos orgánicos: material vegetal y animal en diferentes fases de transformación y el material humificado cuya fracción es la más estable y puede representar de 50 a 85% del material orgánico del suelo (Galantini y Suñer, 2008).

La fracción lábil de la MOS es el material orgánico más joven y activo, está compuesta por restos vegetales, animales y hongos en diferente grado de descomposición. Constituye una importante fuente de nutrientes para las plantas y los microorganismos y presenta un rápido ciclado; es la llamada materia orgánica particulada (MOP), materia orgánica joven (MOJ) o lábil (MOL) (Cambardella y Elliott, 1992; Galantini y Suñer, 2008; Ha *et al.*, 2008). El N presente en la MOP junto con los productos microbianos constituyen casi la totalidad del N potencialmente mineralizable ( $N_0$ ) del suelo. Por tal motivo, esta fracción puede indicar el tamaño del compartimento fácilmente mineralizable de nutrientes (Fabrizzi *et al.*, 2003). Se considera entonces, que esta fracción más lábil puede regular directamente los procesos de amonificación y nitrificación y así proveer el sustrato inicial de dichas vías de transformación del N en el suelo (Jones *et al.*, 2004). Se ha observado que los aminoácidos que constituyen dicha fracción representan una fuente lábil de C y N para los microorganismos y las plantas (Jones y Kielland, 2002). Para estimar el  $N_0$ , Gianello y Bremer (1986) recomiendan el empleo de un método anaeróbico de incubación corta (Nan) (Echeverría *et al.*, 2000).

La disponibilidad de las fracciones orgánicas para los microorganismos dependerá de su composición química, relación C/N, estado de humificación y ubicación dentro de la matriz del suelo (Balesdent *et al.*, 2000). Uno de los principales factores que afectan al

proceso de nitrificación es la relación C/N de MOS. Si la relación C/N es demasiado alta se producirá la inmovilización de N en la biomasa microbiana del suelo, con lo cual se verá afectada la disponibilidad de  $\text{NH}_3$  para las bacterias nitrificantes (Navarro y Navarro, 2003; Berg y Rosswall, 1985).

Por otra parte, como los rastrojos de cultivos son un importante componente de la fracción activa de la MOS (Galantini y Suñer, 2008), el contenido de C, N y la relación C/N de la MOP están fuertemente afectados por la relación C/N, el contenido de N, celulosa y el tamaño de partículas del rastrojo vegetal (Bending y Turner, 1999). Estas características del rastrojo determinan su calidad bioquímica y son consideradas importantes predictoras de la cantidad de N y C inmovilizados (Bending *et al.*, 1998).

Si los materiales orgánicos como los rastrojos de cultivos tienen menos del 1,5 % de N, o lo que es igual una relación C/N de 25 o mayor, se produce la inmovilización del N por los microorganismos del suelo, disminuyendo la disponibilidad del N mineral edáfico. Mientras que si el N de estos rastrojos supera el 1,5%, la mineralización es la reacción dominante con lo cual no existirá descenso en el nivel de N del suelo (Tisdale y Nelson, 1991; Ciarlo y Palma, 2011).

## **Diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco en el suelo: utilización de marcadores de ARN ribosomal**

La gran biodiversidad de los microorganismos que viven en el suelo puede considerarse como la "biomasa microbiana del suelo", un concepto que ha demostrado ser útil para explicar el ciclo de nutrientes y energía (Stockdale y Brookes, 2006). Para un mejor manejo del suelo y minimizar los impactos ambientales negativos, existe la necesidad de una comprensión más detallada y predictiva de las comunidades microbianas responsables de estas actividades y cómo pueden responder al estrés ambiental y cambio climático (Hirsch *et al.*, 2010).

Sin embargo, todas las investigaciones sobre los microorganismos del suelo se ven obstaculizadas por la heterogeneidad de la composición del mismo, la gran cantidad de células individuales ( $10^9$ ) y diversidad ( $>10^6$  taxa distintos) de microorganismos presentes por gramo de suelo (Gans *et al.*, 2005), sumado a la escasez de conocimientos sobre la mayoría de la microbiota (Hirsch *et al.*, 2010). Además, se estima que alrededor del 99 % del número total de microorganismos en la naturaleza no pueden ser aislados. Es así que este porcentaje representa un problema para la caracterización de la comunidad total del suelo. Como consecuencia de esto, y para tener una mejor comprensión del rol de la diversidad microbiana en el funcionamiento del ecosistema, son necesarias otras técnicas que se complementan con los métodos microbiológicos tradicionales (Muyzer, 1999).

Las técnicas desarrolladas en biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la composición y estructura de especies de las comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993). La secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal (ARNr 16S) ha sido ampliamente utilizada como marcador molecular, no solo para el estudio de las relaciones filogenéticas entre los microorganismos, sino también en ecología microbiana para detectar numerosos microbios en su ambiente natural y para determinar la estructura, función y dinámica de las poblaciones bacterianas (Muyzer, 1999).

La diversidad de las comunidades microbianas puede ser investigada a partir de la separación física de productos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando secuencias de genes ADNr 16S como cebadores o primers. En 1993, Muyzer y colaboradores introdujeron una técnica de *fingerprinting* genético o “huella digital de la comunidad” en ecología microbiana, la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE). En la misma, la mezcla de productos PCR es separada en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente lineal de agentes desnaturantes de ADN. Este tipo técnicas de *fingerprinting* molecular proporcionan el patrón o perfil genético de la diversidad de una comunidad, a la vez que permiten la comparación entre comunidades microbianas de diferentes ambientes, o el monitoreo de las mismas en el tiempo (Muyzer, 1999). Una ventaja de esta técnica es que las bandas pueden ser extraídas del gel y secuenciadas para revelar los miembros de la comunidad y su afiliación filogenética (Muyzer y Smalla, 1998).



Debido a la alta coherencia filogenética de las BOA resultante del análisis del ARNr 16S, es que este marcador se ha convertido en el abordaje de elección para la detección molecular del grupo (Kurola, 2006).

Las primeras herramientas moleculares aplicadas en la detección de las BOA en los hábitats naturales se basan en la amplificación de genes ADNr 16S mediante PCR utilizando *primers* ya sea directamente (Kowalchuk *et al.*, 1997) o por PCR anidada (Ward *et al.*, 1997).

Los *fingerprinting* de las comunidades de las BOA en muestras ambientales han sido obtenidos de diferentes maneras (Kurola, 2006). Kowalchuk *et al.* (1997) utilizaron PCR-DGGE a partir del gen ADNr 16S de las BOA y secuenciamiento para caracterizar su diversidad en suelos y sedimentos. Muchos estudios con aplicación de técnicas de *fingerprinting* genéticos se han focalizado en el análisis del ADNr 16S, pero los productos PCR obtenidos a partir de genes funcionales también son frecuentemente utilizados (Muyzer y Smalla, 1998). Además, en general, se encontró una buena concordancia en la descripción de poblaciones de BOA por análisis del ADNr 16S y por el análisis del gen funcional amoA, en particular en la división entre *Nitrospira* y *Nitrosomonas* (Kowalchuk y Stephen, 2001).

La estructura de la comunidad de BOA ha sido investigada en varios ambientes de suelo y ha mostrado cambios en respuesta a las prácticas de manejo en agricultura (Bruns *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Ai *et al.*, 2013). Actualmente, la combinación de PCR anidada-DGGE a partir del ADNr 16S representa un método útil para el estudio de la comunidad de las  $\beta$  Proteobacteria oxidantes del amoníaco en suelos con manejo de fertilización (Ai *et al.*, 2013).

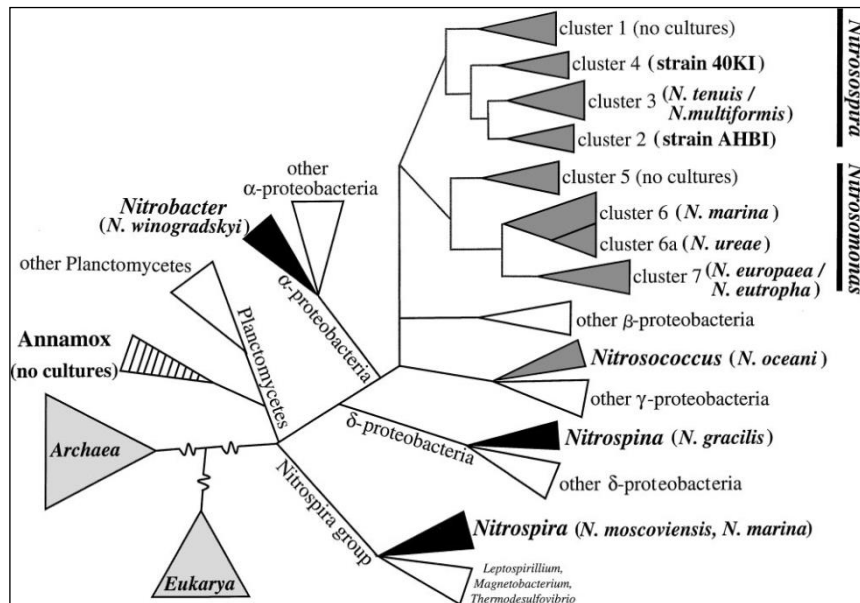
El análisis molecular en suelos agrícolas ha detectado la predominancia de miembros de *Nitrospira cluster 3* en parcelas con labranza y aplicación de fertilizantes (Bruns *et al.*, 1999; Mendum *et al.*, 1999 y 2002; Phillips *et al.*, 2000) y *Nitrospira cluster 4* en suelos sin aplicación de N o no disturbados (Kowalchuk *et al.*, 2000).

## **Filogenia de las bacterias oxidantes del amoníaco**

Tradicionalmente las BOA eran clasificadas en base a características fenotípicas (morfología celular y ultraestructura) en cinco géneros diferentes: *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosomonas* (Prosser, 1989). Esta clasificación ha sido limitada por dificultades en la obtención de cultivos puros debido al lento crecimiento y baja producción celular de las BOA en medios de cultivo. El uso de técnicas cultivo-independientes como las moleculares permiten disminuir estas limitaciones y proporcionan información más completa sobre las relaciones filogenéticas (Kurola, 2006).

En la clasificación genotípica a partir del análisis filogenético molecular de secuencias de genes ADNr 16S, Head *et al.* (1993) propone la reclasificación de *Nitrosovibrio*, *Nitrospira* y *Nitrosolobus* en un género común *Nitrospira*. La investigación molecular de cultivos puros de las BOA mostró que comprenden dos grupos monofiléticos (Fig. 1.2). Uno de los grupos pertenece a la subclase  $\gamma$  Proteobacteria con *Nitrosococcus oceani* y *Nitrosococcus halophilus* como las únicas dos especies conocidas. El otro grupo pertenece a la subclase  $\beta$  Proteobacteria que incluye dos géneros, *Nitrospira* y *Nitrosomonas* (Bothe *et al.*, 2000).

La caracterización molecular de las BOA en sus hábitats naturales ha llevado a una clasificación más amplia de estas bacterias (Head *et al.* 1998). Stephen *et al.* (1996, 1998) sugiere la subdivisión de las  $\beta$  Proteobacteria oxidantes del amoníaco y secuencias ambientales entre 7 a 9 *clusters* basados en secuencias de genes ribosomales 16S. Los *clusters* 1-4 pertenecen a *Nitrospiras ssp.* y del 5-9 consisten de especies de *Nitrosomonas*. Los grupos 1 de *Nitrospira* y 5 de *Nitrosomonas* se caracterizan por presentar sólo secuencias ambientales ya que carecen de cultivos puros de representación (Fig. 1.2). Los *clusters* 1, 2, 3, 4 y 6 son regularmente detectados en muestras de suelo (Stephen *et al.*, 1996, 1998).



**Fig. 1.2** Representación esquemática de la filogenia de BOA autotróficas en base a secuencias de genes ADNr 16S. Las oxidantes del amoníaco se muestran en gris oscuro (adaptado de Kowalchuk y Stephen, 2001).

## Consumo de fertilizantes

La aplicación de fertilizantes contribuyó significativamente al aumento de la producción y el rendimiento de los cultivos a nivel mundial ocurrido en los últimos 60 años, por lo que su consumo creció notablemente en las últimas décadas (Campos *et al.*, 2012). De acuerdo con un informe de la Asociación Internacional de Fabricantes de Fertilizantes (IFA), las perspectivas de demanda son positivas, con un consumo global en expansión, a un promedio anual de un 2,4 % entre los años 2010 y 2015, hasta alcanzar un consumo de 190 millones de toneladas de nutrientes en 2015. La Argentina tuvo una evolución prácticamente similar a las tendencias mundiales. Durante los últimos 20 años, el consumo de fertilizantes se incrementó más de 10 veces, de 300 mil toneladas en 1990 hasta 3,7 millones en el año 2011, que fue el máximo registro de consumo (González *et al.*, 2013).

El consumo total de fertilizantes en la Argentina para la campaña agrícola 2011–12 fue de 3.721.221 de toneladas de producto comercial. El 91% del total del mercado se distribuye entre los fertilizantes nitrogenados con un 47% y los fosfatados con el 44%. Estos nutrientes son de uso histórico en el país y se utilizan tanto en cultivos extensivos

(cereales como oleaginosas). Los productos nitrogenados de uso más frecuente también son la urea granulada y perlada, UAN (Urea + Nitrato de amonio) y CAN (Nitrato de amonio calcáreo) (González *et al.*, 2013).

### Fertilizantes nitrogenados

Los fertilizantes son sustancias químicas inorgánicas que contienen elementos nutritivos para los cultivos. El objetivo básico de su utilización es aumentar la producción y/o calidad de la cosecha. Estas sustancias son simples o compuestas; naturales, industrializadas o de origen sintético y se aplican al cultivo, incorporándolo al suelo, en el agua de riego o en forma foliar (Lavado, 2010).

Existen diferentes tipos de fertilizantes que contienen N, P (fósforo), K (potasio) por separado o bien en productos formados por mezcla de estos elementos (Panichelli, 2002). Los fertilizantes nitrogenados se elaboran a partir de un proceso desarrollado en Alemania en 1910 denominado Haber-Bosch. El mismo permitió al mundo moderno sintetizar  $\text{NH}_3$  a partir del N del aire a elevada temperatura y presión. A partir del  $\text{NH}_3$  obtenido y la combinación de este con distintos elementos surgen varios tipos fertilizantes nitrogenados (Darwich, 2006) (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1** Tipos de fertilizantes nitrogenados y su contenido de N.

<b>Tipos</b>	<b>% N</b>
<b>a) Amoniacales</b>	
Amoníaco Anhidro (gas)	82
Urea	46
Sulfato de amonio (SA)	21
Fosfato diamónico (DAP)	18-21
<b>b) Nitratados</b>	
Nitrato de sodio	16
Nitrato de calcio	15
Nitrato de potasio	13
<b>c) Nitro-amoniacaes</b>	
Nitrato de amonio (NA)	31-34
UAN (Urea + Nitrato de amonio)	30
CAN (Nitrato de amonio calcáreo)	27
Sulfonitrato de amonio	26
<b>d) Compuestos de liberación lenta</b>	
Urea formaldehído	38
Urea recubierta con azufre	39

### La urea como fertilizante nitrogenado

La urea es un sólido blanco cristalino soluble en agua y su presentación es granulada o perlada (Echeverría y Sainz Rosas, 2006). Es el fertilizante nitrogenado más ampliamente utilizado, y su uso ha tenido el crecimiento más rápido de todos los fertilizantes nitrogenados secos. Es el principal fertilizante que se cotiza en el comercio internacional y representa más del 65% del comercio mundial de fertilizantes nitrogenados secos (Gilgames, 2004).

Cuando la urea es aplicada al suelo es hidrolizada por la enzima ureasa, como consecuencia se forma carbonato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>) provocando la elevación temporaria del pH del suelo en el sitio de hidrólisis (Echeverría y Sainz Rosas, 2006). El (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> es muy inestable y se desdobra en amoníaco y anhídrido carbónico. El amoníaco puede ser absorbido por el suelo o volatilizarse (Darwich, 2006).

## **Factores que condicionan el efecto de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados en el suelo**

El efecto que produce la aplicación prolongada (más de 10 años) de N sobre las propiedades del suelo puede ser medido a través del estudio en diferentes etapas de un cultivo, durante un año, estacionalmente, mensualmente o en una fecha en particular dentro de una rotación de cultivos (He *et al.*, 2007; Enwall *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007, 2008; Ge *et al.*, 2008, Ge *et al.*, 2010; Wessén *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Kamaa *et al.*, 2011; Casado Murillo y Abril, 2011).

Durante el proceso de nitrificación del NH<sub>3</sub> derivado del fertilizante nitrogenado, los protones (H<sup>+</sup>) liberados pueden producir acidificación en el suelo (Chien *et al.*, 2008). Si bien, numerosos trabajos demuestran este efecto por la aplicación continua durante varios años (Enwall *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007, 2008; Chien *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010), la magnitud del mismo dependerá del manejo de fertilización (producto empleado, dosis y frecuencia de aplicación) (Darwich, 2006), de las características propias del suelo (pH, MOS, capacidad de intercambio catiónico (CIC), porcentaje de bases intercambiables), (Iturri *et al.*, 2010) y de las condiciones climáticas (Bouman *et al.*, 1995).

### **Manejo de fertilización**

El grado de acidez que induce el fertilizante depende de la fuente que se utiliza. Los fertilizantes nitrogenados que contienen aniones ácidos como el SA acidifican más el suelo que la urea, el NA o el NH<sub>3</sub> (Darwich, 2006). Es así que por cada mol de SA se liberan 4

moles de  $H^+$  mientras que cada mol de urea y NA produce sólo 2 moles de  $H^+$  (Chien *et al.*, 2008).

### Condiciones de suelo

La magnitud del efecto acidificante del fertilizante nitrogenado sobre el suelo varía en función del pH característico y de la capacidad reguladora del mismo. He *et al.* (2007) observaron una disminución importante de 1,71 unidades de pH cuando se utilizó urea en un suelo de pH entre 3,7 y 6; mientras que en suelos de  $pH \geq 8$  se registraron bajas disminuciones y sin significancia respecto a un testigo con la aplicación de 300 kg de urea por año (Chu *et al.*, 2007; Ai *et al.*, 2013).

La capacidad reguladora o poder *buffer* del suelo, es la resistencia que ofrece el mismo a variar su pH ante el agregado de iones  $H^+$  como los derivados de fertilizantes nitrogenados. La misma depende de la cantidad y naturaleza del complejo coloidal (arcilla + MOS) y de la naturaleza de los cationes que saturan el complejo (González *et al.*, 2011). La CIC es la cantidad máxima de cationes que puede adsorber el complejo, a mayor contenido de MOS, mayor CIC (González *et al.*, 2011; Álvarez y Steinbach, 2010). Por lo tanto, la disminución del pH será menor en suelos con mayor contenido de MOS, debido a una mayor capacidad buffer (Fabrizzi *et al.*, 1998). Chien *et al.* (2008) demostró que un suelo arcilloso disminuía el pH en 0,73 unidades, mientras que un arenoso en una 1 unidad al aplicar SA, demostrando de esta manera, la capacidad de las arcillas para regular la acidez del suelo.

### **Antecedentes de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados sobre la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco**

La disponibilidad de nutrientes para los cultivos a través de la descomposición de los residuos, inmovilización y mineralización depende de la actividad de la biota del suelo (Bünemann y Mc Neill, 2004). La fertilización es una práctica muy generalizada en los

sistemas agrícolas, que desde el punto de vista de un manejo sustentable, los criterios para el uso del fertilizante no deben desconocer los efectos que produce la fertilización sobre el suelo y sus procesos microbianos (Abril, 2002).

Es bien sabido que los diferentes sistemas de labranza, la fertilización mineral y los rastros de cultivos afectan a la comunidad de BOA (Yu *et al.*, 2010). Estudios a campo en diferentes suelos han evaluado el efecto de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados sobre dicha comunidad, debido a que la aplicación de N representa un factor vital para la misma (Yun-fu *et al.*, 2008). El efecto de la fertilización nitrogenada a largo plazo sobre la comunidad de BOA, parece depender fundamentalmente del efecto acidificante del fertilizante empleado y de las características del suelo. Biederbeck, *et al.*, (1995); Chu *et al.*, 2008; Shen *et al.* (2008); Yu *et al.* (2010) y Ai *et al.* (2013) observaron que en suelos de textura fina ligera a moderadamente ácidos y de textura gruesa ligera a moderadamente alcalinos, el uso de urea afectó positivamente a las BOA aumentando la abundancia y diversidad con cambios en la estructura de la comunidad. Mientras que, cuando se aplicó SA de mayor poder acidificante en suelos arcillosos a limosos medianamente ácidos, los efectos sobre dicha comunidad fueron negativos (Khonje *et al.*, 1989; He *et al.*, 2007; Enwall *et al.*, 2007).



## **Manejo agrícola en la zona de estudio**

El suelo de la serie Marcos Juárez ubicada en la zona Este de la provincia de Córdoba es oscuro profundo y bien drenado con características propias de un suelo Argiudol típico (INTA, 1978). Desde el punto de vista químico presentaría buena capacidad buffer debido al contenido de MOS y saturación de bases en el complejo (Iturri *et al.*, 2010), además se lo puede clasificar dentro de los suelos ligeramente ácidos (González *et al.*, 2011). Constituye el típico representante de suelos buenos de la región Pampeana por ser fértil y productivo con amplia aptitud para cultivos intensivos y extensivos, forrajes y pasturas (INTA, 1978).

El departamento Marcos Juárez se ubica al Este de la provincia de Córdoba correspondiendo a la región Pampeana Ondulada (Lavado y Steinbach, 2010). Su superficie es de 848.683 ha, de las cuales 703.054 has son de uso agrícola, lo que representa el 83 % de la superficie total (MinAgri, 2015). En lo que se refiere a la productividad agrícola, este departamento es el principal productor provincial de soja y trigo y el segundo de maíz. En el departamento Marcos Juárez, durante las campañas 2012 - 2015, en promedio la superficie de siembra fue de 753.733 has, de las cuales el 79 % corresponde a soja, el 7 % a trigo y el 14% a maíz (MinAgri, 2015).

La productividad de los cultivos se mantiene a través del reemplazo de recursos por insumos además de una mejor genética y protección. El manejo de fertilización, en la región Pampeana depende de muchos factores, siendo el más importante, el factor económico (Lavado, 2010).

La respuesta del cultivo de maíz a las aplicaciones de N depende de características edáficas, climáticas y de manejo (Quiroga *et al.*, 2003). La recomendación habitual de fertilización en maíz en la región Pampeana, es aplicar el N de manera fraccionada (Copperi *et al.*, 2013), a la siembra y en V6 donde la demanda del cultivo crece rápidamente (Darwich, 2006). Un estudio realizado por Gudelj *et al.* (2004) en 18 ensayos

de la serie Marcos Juárez, mostró que la aplicación de N en estos dos estados del cultivo, en general, no produjo diferencias significativas en el rendimiento.

La dosis de N media aplicada en maíz por los productores en la zona de estudio es de 80 a 90 kg de N ha<sup>-1</sup> y 12 a 15 kg de P ha<sup>-1</sup>. Estos valores se corresponden con los utilizados a nivel nacional para maíz (Alvarez *et al.*, 2013). El cultivo de soja en la zona al igual que a nivel nacional, sólo recibe una baja dosis de P, y no se fertiliza o se fertiliza muy poco con N, ya el N requerido proviene principalmente de la fijación biológica. Para la región Pampeana en numerosos ensayos realizados en lotes con historia sojera, no se observó respuesta a la fertilización con N por lo que, la fertilización nitrogenada en soja es muy baja a nula (Gutiérrez Boem, 2013). En cuanto al cultivo de trigo, la dosis media de N generalmente no supera los 60-70 kg ha<sup>-1</sup> y para P alcanza unos 25 kg ha<sup>-1</sup>, estas dosis son utilizadas también a nivel nacional (Alvarez *et al.*, 2013).

## **Problemática**

Hasta el presente, no se han reportado trabajos que caractericen a la comunidad de las BOA en suelos con buena capacidad buffer como los Argiudoles de la zona estudiada fertilizados con urea a largo plazo. La aplicación de fertilizantes a largo plazo puede tener efectos contrapuestos sobre las BOA, actuando como sustrato y causando simultáneamente la acidificación del suelo que inhibe la actividad de este grupo bacteriano. Este estudio permitirá evaluar cuál de estos dos efectos juega un rol más importante dentro de las comunidades oxidantes del amoníaco.

## **Hipótesis**

-La aplicación prolongada de urea en suelos con buena capacidad amortiguadora, aumenta la abundancia, actividad, diversidad genética y modifica la estructura de la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

-Caracterizar la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco bajo el efecto acumulado de la aplicación de urea a largo plazo.

### **Objetivos Específicos**

-Determinar la cantidad y calidad de los rastrojos de cultivos, materia orgánica de suelo y estimar la disponibilidad de nitrógeno inorgánico potencial en los distintos esquemas de fertilización con urea.

-Evaluar el efecto de la aplicación de urea sobre la acidez y el contenido de nitrógeno inorgánico del suelo bajo las distintas dosis de fertilización.

-Estudiar el efecto de la fertilización con urea sobre la abundancia, actividad, diversidad y estructura de la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco.

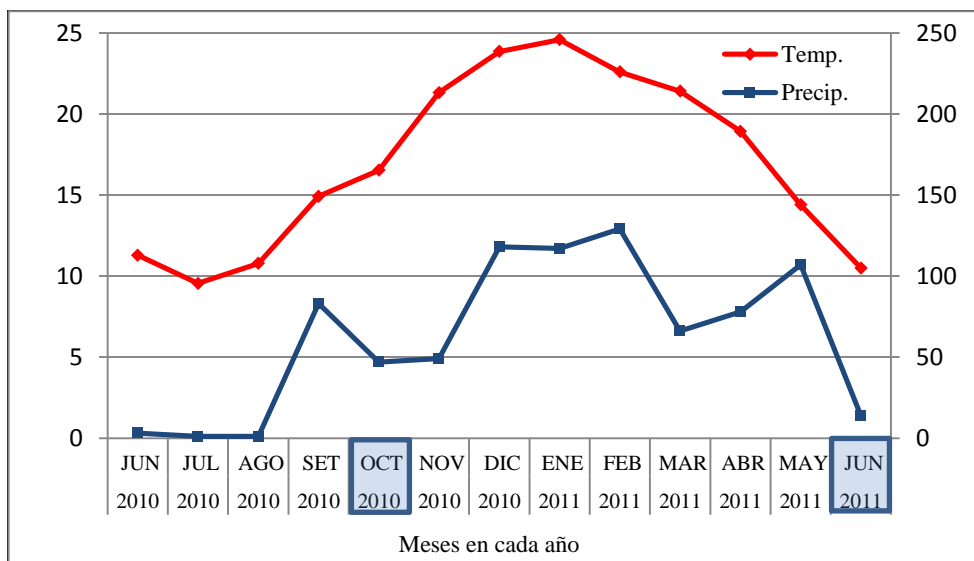
-Identificar las relaciones entre las variables químicas y las variables biológicas estudiadas.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Descripción del área de estudio

El trabajo se realizó durante la campaña 2010/2011 en un ensayo establecido desde 1993 en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Marcos Juárez (32° 41' de latitud Sur y a 62° 7' longitud Oeste). El suelo está clasificado como Argiudol típico perteneciente a la serie Marcos Juárez, con capacidad de uso I (INTA, 1978). La serie Marcos Juárez presenta un horizonte A (0-19 cm de profundidad) con características propias de un suelo franco-limoso (25% arcilla, 69% limo y 5,4% arena fina). El contenido de MOS es de 3,26 %; el de N total es de 1,8 g kg<sup>-1</sup> de suelo. El pH es de 6,4; la CIC 19,3 cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup> y la saturación de bases es del 91% (INTA, 1978).

El ensayo se ubica en una zona con dominio climático subhúmedo, en la isoterma media de 17,3 °C. El régimen hídrico presenta una deficiencia entre los meses de mayo y fines de agosto; a partir del mes de septiembre se registran las mayores precipitaciones (Fig. 2.1). La precipitación media anual presenta valores superiores a los 800 mm (Arce y Díaz, 1996).



**Fig. 2.1** Condiciones climáticas dadas en la zona de la EEA Inta Marcos Juárez, antes y durante el período estudiado desde octubre 2010 a junio 2011. Los meses remarcados corresponden a los muestreos.

## **Ensayo y diseño experimental**

El ensayo en que se realizó este estudio consta de una secuencia de cultivos trianual con maíz – trigo/soja de segunda – soja de primera, todos en siembra directa. El diseño experimental es en parcelas divididas, en cuyas parcelas principales se colocaron las distintas fases de la rotación, en las subparcelas los niveles de fertilización y en las subsubparcelas los sistemas de labranza y siembra.

El diseño utilizado repite la secuencia en distinta fase, por lo tanto, en todos los años están presentes todos los cultivos en distintas parcelas, de modo que un cultivo se repite en una misma parcela cada tres años (Masiero *et al.*, 2006).

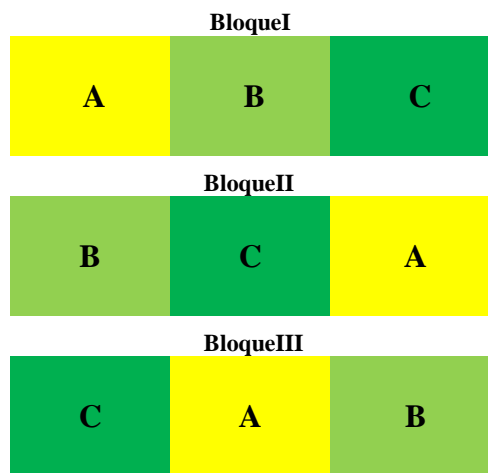
Para el presente estudio se seleccionó una fase cuyas parcelas provenían de soja de primera y el cultivo posterior fue maíz (*Zea mays* L.), todas bajo siembra directa continua y luego de 4 ciclos de cultivo. El diseño quedó establecido en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones, siendo los tratamientos las distintas estrategias de fertilización nitrogenada con urea en el cultivo de maíz.

**TRATAMIENTO A:** Maíz sin fertilización.

**TRATAMIENTO B:** Maíz con 90 kg/ha de N.

**TRATAMIENTO C:** Maíz con 165 kg/ha de N.

El número de unidades experimentales quedó definido de la siguiente manera: 1 cultivo x 3 niveles de fertilización x 3 repeticiones= 9 unidades experimentales. El tamaño de la unidad experimental fue de 9 x 50 m. En la Fig. 2.2 se muestra el diseño del experimento.



**Fig. 2.2** Esquema representativo del diseño del experimento en el ensayo con los tratamientos seleccionados en la campaña 2010-2011.

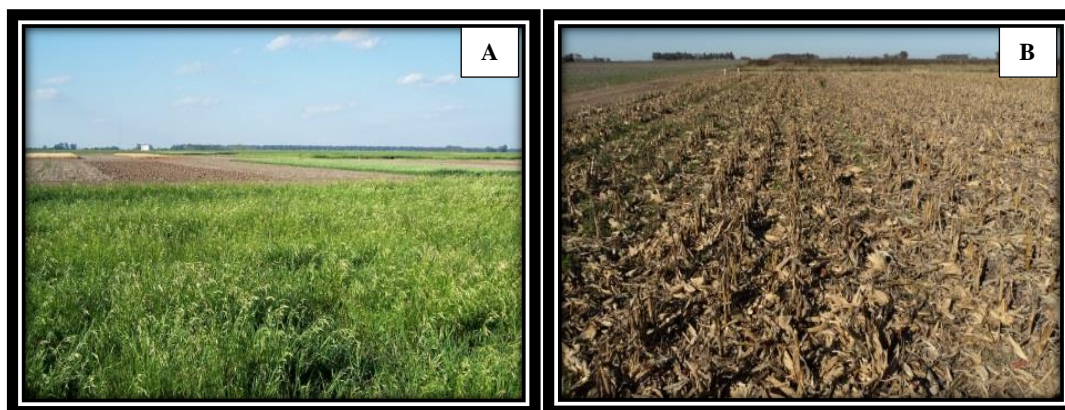
En el tratamiento A (Testigo) no se fertiliza ningún cultivo de la rotación. El tratamiento B representa la dosis de N aplicada en maíz por el productor en la zona de estudio y es aproximadamente la mitad de la dosis de reposición (C). El tratamiento C iniciado en el año 1998, representa la dosis de reposición, cuyo criterio de aplicación se realiza en función del total de nutriente que se estima absorberá el cultivo (Álvarez *et al.*, 2013). La fertilización nitrogenada combinada con P se realiza al momento de la siembra para todos los cultivos con MAP, DAP, SA y urea; excepto en soja de 2<sup>da</sup> que no se aplica urea y en maíz que se realiza una refertilización con urea en el estadio V4-V6 (entre 4 y 6 hojas). Los detalles del manejo de la fertilización por cultivo en los tratamientos B y C se presentan en la Tabla 2.1.

Además se consideró como situación de referencia (SR), una pastura natural adyacente iniciada el mismo año del ensayo (Fig. 2.3). La misma cuenta con una población de gramíneas como *Festuca sp*; *Agropirum sp.* y *Lolium sp.*

**Tabla 2.1** Dosis de N aplicadas en el ensayo en cada cultivo para cada tratamiento (T). B: fertilización uso actual del productor y C: fertilización de reposición.

T	Cultivo	Fertiliz.	Dosis N (Kg. ha <sup>-1</sup> . año)	Total N aplicado	Fecha de aplic.	Siembra	Modo de aplic.			
B	Trigo	UREA	68	98	Julio	Mediado Julio	Voleo			
		MAP <sup>1</sup>	7							
		DAP <sup>1</sup>	2							
		SA	21							
	Soja 2 <sup>da</sup>	Arrancador	7	11,5	Diciembre	Dic.				
		MAP	4							
SA		0,5								
C	Trigo	UREA	136	196	Julio	Mediado Julio	Voleo			
		MAP	14							
		DAP	4							
		SA	42							
	Soja 2 <sup>da</sup>	Arrancador	14	23	Diciembre	Dic.				
		MAP	8							
SA		1								
B	Soja 1 <sup>ra</sup>	UREA	2	7	Noviembre	Fines Nov.	Voleo			
		MAP	2							
		DAP	1							
		SA	2							
C		UREA	4	14				Noviembre	Fines Nov.	Voleo
		MAP	4							
		DAP	2							
		SA	4							
B	Maíz	UREA	69 <sup>2</sup>	90	Enero	Oct.	Voleo			
		MAP	2		Octubre					
		DAP	13							
		SA	6,5							
C		UREA	122 <sup>2</sup>	165	Enero	Oct.	Voleo			
		MAP	4		Octubre					
		DAP	26							
		SA	13							

1- MAP (Fosfato monoamónico); DAP (Fosfato diamónico). 2- Refertilización en Maíz en el estadio V4-V6.



**Fig. 2.3** Vista general del ensayo de larga duración y la pastura natural adyacente INTA Marcos Juárez (A). Parcela del ensayo de larga duración bajo el tratamiento C con rastrojos de maíz, Junio del 2011 (B).

## **Muestreo de suelo y rastrojos**

Se realizaron dos muestreos, definiendo dos épocas: previo a la siembra de maíz (sobre el rastrojo de soja<sup>1ra</sup>) el 18/10/2010 y en postcosecha de maíz (sobre el rastrojo de maíz) el 27/06/2011 (Fig. 2.3 B).

Las muestras de suelo fueron recolectadas de 0-10 cm de profundidad con barreno 2,5 cm de diámetro tomando 30 submuestras por parcela conformando una muestra compuesta. Conjuntamente se recolectaron de la superficie de suelo muestras de biomasa aérea de rastrojos (libres de partículas de suelo) con aro de 0,03 m<sup>2</sup> de superficie, juntando 6 submuestras por parcela para una muestra compuesta. Para la toma de muestras en la Pastura Natural (SR) se dividió en tres zonas tomando el mismo número de submuestras que en el ensayo tanto de suelo como de rastrojos.

## **Acondicionamiento de las muestras**

Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente por 24 h, tamizadas por 2 mm y almacenadas a 4 °C hasta las determinaciones de abundancia, actividad enzimática nitrificante, contenido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Previamente al secado de suelo se extrajeron aproximadamente 50 g por muestra para determinar el contenido de humedad



gravimétrica expresada en porcentaje, cuyo dato será utilizado en las variables expresadas en base seca. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(Ph-Ps)}{(Ps-tara)} \times 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

Dónde:

Ph: Peso húmedo de la muestra.

Ps: Peso seco de la muestra.

Las determinaciones de MOS, MOP, pH, C y N e incubación anaeróbica de suelo se realizaron con muestra seca. La extracción de ADN ambiental fue a partir de suelo húmedo previamente tamizado por 2 mm y conservado a -20°C. Las extracciones fueron posteriormente almacenadas a la misma temperatura.

Las muestras de rastrojo fueron secadas en estufa a 60°C por 48 h, pesadas, molidas y almacenadas hasta las determinaciones de C y N.

## **Determinaciones químicas**

### **Contenido de Nitrógeno Inorgánico del Suelo**

El contenido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se determinó mediante el método del ácido Fenoldisulfónico (Bremner, 1965). Se colocaron 10 g de suelo húmedo (previamente tamizado por 2 mm) en un frasco plástico de 125 ml con tapa. Luego se agregó 30 ml de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N y se agitó por 10 min en agitador mecánico. Posteriormente se realizó el filtrado de la solución y se tomaron 5 ml del extracto, el que se llevó a sequedad en bañomaría hirviente. Luego se agregaron 2 ml de ácido fenoldisulfónico al extracto seco, se dejó reposar 10 min y se adicionaron 40 ml de agua destilada y 8 ml de NaOH 40%. Posteriormente se dejó enfriar y se realizó la lectura en espectrofotómetro SPECTRUM SP 1105 a 420 nm. El contenido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en mg. kg<sup>-1</sup> suelo seco fue calculado de la siguiente manera:

$$N - NO_3^- \text{ (mg. kg}^{-1} \text{ suelo seco)} = A \times Fc \times Fh \quad \text{Ec. 2.2}$$

Dónde:

A: Absorbancia de la muestra.

Fc: Factor de la curva de calibración expresado en mg/kg de suelo.

Fh: Factor de humedad de la muestra.

El contenido N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se determinó por microdestilación directa por arrastre de vapor (Keeney, 1982). Se pesaron tres porciones de 5 g de suelo húmedo (previamente tamizado por 2 mm) y se le agregaron 10 ml de KCL 1 N. Luego se agitó 30 min en forma rotativa y se dejó decantar. Posteriormente se transfirieron 2 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo y se adicionaron 50 mg MgO y 30 mg de aleación de Devarda más 1 gota de antiespumante. Finalmente se destilaron 2 ml por arrastre de vapor y se tituló con HCl 0,1 N. La ecuación 2.3 representa los cálculos realizados.

$$N - NH_4^+ \text{ (mg. kg}^{-1} \text{ suelo seco)} = (M - B) \times K \times F \text{ (mg. kg}^{-1}) \quad \text{Ec. 2.3}$$

Dónde:

N como amonio expresado en µg N/g de suelo = mg N/kg de suelo.

M: mL de HCl gastados en la muestra.

B: mL de HCl gastados en el blanco.

K: Constante del ácido.

F: (15/PS)-1.

PS: Peso seco de la muestra (g).

### Acidez de Suelo

Las mediciones de pH se realizaron de acuerdo a una relación suelo-agua de 1: 2,5 (IRAM 29410, 1999). Se pesaron 10 g de suelo (tamizado por 2 mm) en un vaso de precipitado. Luego se agregaron 25 ml de agua destilada y se agitó con varilla de vidrio. Posteriormente se dejó reposar entre 2 a 4 h y se midió el pH inmediatamente luego de agitar hasta un valor estable.

## Materia Orgánica Total y Nitrógeno Total

El contenido de MOS o MOT se estimó a partir de la determinación de CO oxidable por mezcla oxidante fuerte a escala semi-micro (IRAM 29571-2, 2009). Se pesaron 0,5 g de suelo (previamente tamizado por 2 mm) y se adicionaron 5 ml de  $K_2Cr_2O_7$  1N y 10 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. Se deja en reposo durante 30 min. Posteriormente se le adicionaron 15 ml de  $H_2O$  más 3-4 gotas de solución indicadora y la solución de *sal de Mohr* para titular el exceso de dicromato hasta el viraje de color verde brillante al rojo. El porcentaje del CO del suelo (COS) es calculado mediante la siguiente ecuación:

$$COS (\%) = \frac{(V_b - V_m) \cdot M \cdot 3}{p} \times 0,1 \quad \text{Ec. 2.4}$$

Dónde:

$V_b$ : Volumen de la solución de *sal de Mohr* consumidos en la titulación del blanco (ml).

$V_m$ : Volumen de la solución de *sal de Mohr* consumidos en la titulación de la muestra (ml).

$M$ : Molaridad de la solución de la *sal de Mohr* (mmol/ml).

$3$ : Factor de conversión del nivel de oxidación del C (mg/mmol).

$p$ : Peso de la muestra (g).

El % de MOS se obtuvo multiplicando el % COS por el factor de Van Bemmelen cuyo valor es de 1,724. Este factor es ampliamente utilizado en cualquier tipo de suelo y surge de asumir que la MOS contiene en promedio un 58 % de C (Tabatabai, 1996)

Finalmente el % MOS se llevó primeramente a  $kg \cdot Mg^{-1}$  y luego a  $Mg \cdot ha^{-1}$  de suelo mediante la siguiente ecuación:

$$MOS (Mg \cdot ha^{-1}) = \frac{[MOS (kg \cdot Mg^{-1}) \times Dap (Mg \cdot m^{-3}) \times E (m) \times S (m^2 \cdot ha^{-1})]}{1000} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Dónde:

$Dap$ : Densidad Aparente ( $Mg \cdot m^{-3}$ ).

$E$ : Espesor de la capa arable expresada en metros.

$S$ : Superficie de 1 (ha) = 10000  $m^2$ .

El contenido de nitrógeno total (NT) de la MOS se determinó por el método de Kjeldahl modificado (IRAM 29572, 2011). Se pesaron entre 0,25-0,50 g de suelo (previamente tamizado por 0,5 mm) en un tubo de digestión y se agregaron 1 g de mezcla catalítica y 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla se llevó a digestión a 380 °C hasta cambio de color a verde claro, se dejó entibiar por 10 min y se le agregó 20 ml de agua destilada dejando enfriar completamente. Posteriormente se adicionaron 20 ml de NaOH 10N y se trasvasó la mezcla digerida a un balón para luego realizar la destilación. Se recolectaron 30 ml del destilado en un Erlenmeyer con 5 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Finalmente se tituló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N hasta el viraje de color a verde. El porcentaje N de suelo o total se obtuvo mediante la ecuación:

$$NT (\%) = \frac{(V_m - V_b) \cdot c(H^+) \cdot M_N}{m} \times 0,1 \quad \text{Ec. 2.6}$$

Dónde:

V<sub>m</sub>: Volumen de la solución de ácido consumido en la valoración de la muestra (ml).

V<sub>b</sub>: Volumen de la solución de ácido consumido por el blanco (ml).

c (H<sup>+</sup>): Concentración de H<sup>+</sup> en la solución del ácido (mmol/ml).

M<sub>N</sub>: Masa de un mmol de N= 14 (mg/mmol).

M: Peso de la muestra (g).

Luego al % NT se lo cambió a unidades de kg. Mg<sup>-1</sup> y se le restaron los valores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> determinados para obtener el nitrógeno orgánico del suelo (NOS), el cual finalmente se expresó en Mg. ha<sup>-1</sup> de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$NOS (Mg \cdot ha^{-1}) = \frac{[NOS (kg \cdot Mg^{-1}) \times Dap (Mg \cdot m^{-3}) \times E (m) \times S (m^2 \cdot ha^{-1})]}{1000} \quad \text{Ec. 2.7}$$

## Materia Orgánica Particulada y Nitrógeno Particulado

Mediante fraccionamiento por tamaño de partícula se determinó la fracción mayor a 106 µm de la materia orgánica particulada (MOP) realizando una adaptación de la metodología de Cambardella y Elliott (1992) con tamizador ultrasónico SPARTAN (Fritsch). Se colocaron 30 g de suelo (previamente tamizado por 2 mm) en un recipiente plástico con tapa y se agregaron 100 ml de hexametafosfato al 0,5 %. Luego se llevó a agitación por 3 h. Posteriormente, la muestra se colocó sobre un tamiz de 106 µm y se lavó hasta que el agua del tamiz salió completamente limpia. El material remanente sobre el tamiz se secó en estufa a 60 °C y se pesó. El contenido MOP obtenido en (kg/Mg) se llevó a Mg. ha<sup>-1</sup> mediante la siguiente ecuación:

$$\text{MOP (Mg. ha}^{-1}\text{)} = [\text{MOP (kg Mg}^{-1}\text{)} \times \text{Dap (Mg m}^{-3}\text{)} \times \text{E (m)} \times \text{S (m}^2\text{ ha}^{-1}\text{)}] / 1000 \quad \text{Ec. 2.8}$$

Dónde:

Dap: Densidad Aparente (Mg/m<sup>3</sup>).

E: Espesor de la capa expresada en m.

S: Superficie de 1 (ha) = 10000 m<sup>2</sup>.

La fracción obtenida fue molida y tamizada por 500 µm y se le determinó el contenido de C y N por combustión en seco con analizador LECO Truspec CN (Merry y Spouncer, 1998). El contenido de C y N obtenidos en porcentaje se expresaron como Mg. ha<sup>-1</sup> de MOP de la siguiente manera:

$$\text{C, N (Mg . ha}^{-1}\text{ MOP)} = [\text{MOP Mg . ha}^{-1} \times \% \text{C, N} \div 100] \quad \text{Ec. 2.9}$$

## Rastrojos y aporte de Carbono y Nitrógeno

Se determinó el peso seco de los rastrojos ( $\text{Mg. ha}^{-1}$ ) y a partir de la concentración de C y N en los mismos se calculó la cantidad de C y N aportados. Los resultados se expresaron en  $\text{Mg. ha}^{-1}$  de la siguiente forma:

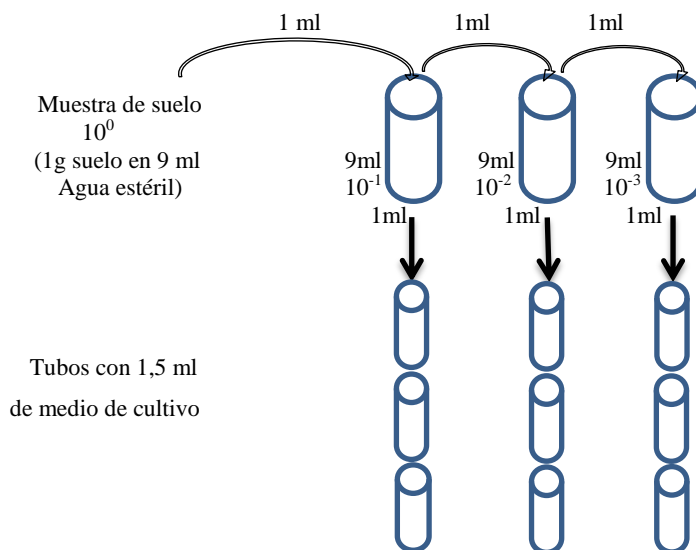
$$\text{C, N (Mg. ha}^{-1} \text{ Rastrojos)} = [\text{Peso Rastrojos Mg. ha}^{-1} \times \% \text{ C, N} \div 100] \text{ Ec. 2.10}$$

## Determinaciones microbiológicas

### Recuento de bacterias oxidantes del amoníaco

Los medios de cultivo selectivos y la utilización de suelo restringen el crecimiento bacteriano a los géneros *Nitrosomonas* sp. y *Nitrospira* sp. más comúnmente encontrado en suelos; aunque no se descarta que otro tipo de microorganismos puedan crecer como contaminantes en los medios, su efecto sobre los valores de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  en los suelos no son significativos (Schmidt y Belser, 1994). Como la nitrificación es un proceso de dos fases con diferentes grupos de bacterias involucrados, se utilizan dos medios de cultivo líquidos químicamente definidos selectivos para cada uno de estos grupos (Miller Gallego, 2012).

La abundancia de las BOA se cuantificó a través del método de recuento del Número Más Probable (NMP) (Alexander, 1965) en medio líquido selectivo con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{CaCO}_3$  según (Frioni, 2006). Belser y Mayz (1982) indican que aunque esta técnica puede resultar sobre estimativa es comúnmente muy utilizada en diversos estudios, entre ellos en ecología. Se preparó una solución de suelo húmedo pesando 1 g (previamente seco por 24 h y tamizado por 2 mm) en 9 ml de agua destilada estéril. A partir de la misma se prepararon 3 diluciones (-3, -2 y -1). Luego se sembró por triplicado 1 ml de cada dilución en tubos que contenían 1,5 ml de medio líquido y se incubó durante 28 días a 29 °C. En el siguiente esquema se ilustra el procedimiento:



La lectura se realizó con la adición de 10 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 10 gotas de Difenilamina sulfúrica. Luego se contaron los tubos de reacción positivos (color azul por la presencia de  $\text{NO}_2^-$ ), se ordenó la cifra para obtener el número característico y se ingresó a la tabla de Mc. Grady para el NMP. El cálculo de abundancia se realizó de la siguiente manera:

**NMP**-----en 1 ml sembrado en el tubo con medio de cultivo.  
 x-----en 10 ml del tubo de la dilución usada (la más concentrada).  
 x-----en 10 ml de la dilución  $10^0$ .  
**n°**-----en 1 g de suelo.

Los resultados fueron expresados como  $\log_{10}$  del n° de bacterias /g de suelo.

### Actividad nitrificante potencial

El potencial de nitrificación de suelo (PNS) es determinado bajo exceso de sustrato y sin limitaciones de difusión de oxígeno (Fortuna *et al.*, 2003). Estas condiciones promueven la contribución dominante de las BOA en el proceso ya que se ha detectado que son las responsables de entre el 69-76% de la actividad nitrificante en suelos fertilizados (Ouyang *et al.*, 2016). El PNS se estimó por el método *Shaken Soil Slurry* según (Drury *et al.*, 2008). Se pesaron 2 g de suelo húmedo previamente tamizado por 2 mm y se incubaron con una solución conteniendo 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  (como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) más 1 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  (como  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) a 25 °C y a 180 rpm. Luego se tomaron alícuotas de 2 ml en

intervalos regulares de tiempo a las 0, 2, 6, 12, 22 y 24 h desde el comienzo de la incubación. Las mismas fueron centrifugadas a 14000 rpm por 10 min para obtener una solución límpida. Finalmente se tomó 1 ml de la solución y se cuantificó el contenido de  $\text{NO}_3^-$  mediante el método del ácido Fenoldisulfónico descrito anteriormente. La tasa de nitrificación fue determinada por regresión lineal de las concentraciones de  $\text{N-NO}_3^-$  en el tiempo (h). El valor de la pendiente ( $\text{mg N-NO}_3^- / \text{kg suelo}$ ) obtenido se multiplicó por 24 (h) y se obtuvo la cantidad de  $\text{N-NO}_3^-$  expresada en  $\text{mg/kg suelo / día}$  (Ec. 2.10). Si bien en esta metodología se mide el producto final del proceso de nitrificación, es decir la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la muestra, dicha cantidad es equivalente a la concentración de  $\text{NH}_3$  nitrificado por las BOA, ya que como se nombró anteriormente, se considera que la oxidación del  $\text{NH}_3$  es el paso limitante en el proceso de nitrificación (Kowalchuk y Stephen, 2001).

$$\text{PNS (mg N - NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{Pendiente (mg N - NO}_3^-) \times 24 \text{ (h)} \quad \text{Ec. 2.11}$$

### Nitrógeno potencialmente mineralizable

El N potencialmente mineralizable del suelo proviene principalmente de la MOP (Frabrizzi *et al.*, 2003) y su estimación se realizó a través del método de Incubación anaeróbica de suelo (Echeverría *et al.*, 2000). Dicho método propuesto por Gianello y Bremner (1986), llamado N anaeróbico (Nan) consiste en la determinación de  $\text{NH}_4^+$  producido en una muestra de suelo luego de que ésta ha sido incubada en condiciones de anaerobiosis. La cantidad de  $\text{NH}_4^+$  se cuantificó por microdestilación directa por arrastre de vapor (Keeney, 1982).

Para la incubación de la muestra se colocaron 10 g de suelo (previamente tamizado por 2 mm) más 10 ml de agua destilada en un tubo de ensayo. Luego se completó el volumen con agua y se tapó herméticamente generando un ambiente anaeróbico. Posteriormente se incubó durante 7 días a 40°C. La destilación se realizó colocando en un balón el contenido del tubo de incubación (previamente lavado con KCl 4M) más 0,2 g de MgO. Luego se recolectaron 30 ml del destilado en un Erlenmeyer con 5 ml de ácido



bórico como indicador y se tituló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N hasta el cambio de color a verde. El Nan se expresó como N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en mg/kg de suelo y se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Nan (mg N - NH}_4^+ \cdot \text{kg}^{-1}\text{s)} &= (M - B) \times \frac{0,07}{P} \times 1000 \\ &= (M - B) \times 7 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suelo} \quad \text{Ec. 2.12} \end{aligned}$$

Dónde:

Nan: N como amonio expresado en  $\mu\text{g N/g}$  de suelo =  $\text{mg N/kg}$  de suelo.

M: mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N gastados en la muestra.

B: mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N gastados en el blanco.

P: Peso de la muestra de suelo utilizada (10 g).

Se considera que 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N equivale a 0,07 g de N (70  $\mu\text{g}$  de N).

### Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN a partir de 0,5 g de suelo con kit de extracción comercial MP (Biomedicals). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis con el método del Minigel de agarosa al 1% junto a un marcador de peso molecular MilMarker (Biodynamics) teñido con GelRed 1X (Biotium) y visualizado bajo luz UV. Se determinó la concentración de ADN por mediciones de absorbancia a 260 nm en NANO DROP 8000 (Thermo Scientific).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes ribosomales 16S se realizó una PCR anidada o *nested* PCR debido a la baja abundancia de las BOA en muestras ambientales (Ward *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2007). Esta estrategia consiste en la amplificación de fragmentos ADN obtenidos con *primers* específicos, como los de las  $\beta$  Oxidantes del amonio (Kowalchuck *et al.*, 1997) y una reamplificación de estos productos con *primers* universales aptos para correr en geles desnaturizantes. La misma es utilizada en estudios de patrones de bandas complejos como los de las comunidades microbianas y resalta la importancia ecológica de

un grupo de bacterias en particular dentro de las comunidades (Muyzer y Smalla, 1998). Además tiene como ventaja que el uso de *primers* grupo específicos incrementa la sensibilidad de detección (Brinkhoff y Muyzer, 1997).

En la primera amplificación se utilizaron los *primers* CTO F189 y R654 de secuencias génicas conservadas presentes en la  $\beta$ -subdivisión de la clase Proteobacterias de las bacterias oxidantes del amoníaco (Tabla 2.2), los que amplifican una región de 465 bp ubicada entre los dominios variables V2 y V3 del ADN que codifica para el gen ribosomal 16S.

La mezcla de reacción de un volumen final de 25  $\mu$ l por tubo contenía *buffer* GoTaq polimerasa 1X (Promega), enzima 0,06 U/ $\mu$ l, dNTPs 0,2 mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cada *primer* en una concentración de 0,2  $\mu$ M, BSA 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l, DMSO 5 % (v/v) y aproximadamente 100 ng de ADN. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 45 seg de *annealing* a 55°C y 45 seg de extensión a 72°C, con un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

El producto generado fue utilizado como templado para la segunda amplificación con los *primers* F341-GC y R534 que flanquean un fragmento de aproximadamente 200 pb del dominio V3 del ADN que codifica para el gen ribosomal 16S. La incorporación de una secuencia rica en GC en el *primer* F se utilizó para evitar la desnaturalización completa durante la electroforesis en gradiente desnaturalizante (Basile, 2009).

La segunda mezcla reacción de un volumen final de 40 $\mu$ l por tubo contenía *buffer* GoTaq polimerasa 1X (Promega), enzima 0,04 U/ $\mu$ l, dNTPs 0,2 mM de cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, cada *primer* en una concentración de 0,1 $\mu$ M, BSA 0,2 $\mu$ g/ $\mu$ l, DMSO 5 % (v/v) y 1,5  $\mu$ l de producto PCR. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las utilizadas para los *primers* CTO.

Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador MULTIGENE GRADIENT TC 9600 (Labnet) y todos los productos generados fueron chequeados en gel

de agarosa al 1% mediante electroforesis teñidos con GelRed1X y visualizados bajo luz UV con transiluminador TM 26 (Labnet).

**Tabla 2.2** *Primers* de genes ribosomales 16S utilizados en las amplificaciones por Nested PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Blanco	Referencia
FCTO189	GGAGAAAGYAGGGGATCG	B-Proteobacterias oxidantes del amoníaco	(Kowalchuck <i>et al.</i> , 1997)
RCTO654	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC	B-Proteobacterias oxidantes del amoníaco	(Kowalchuck <i>et al.</i> , 1997)
F341-GC	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGG GCGG GGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGC AGCAG	Bacteria	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
R534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Universal	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)

### Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

El patrón genético de la comunidad se observó mediante el método de *fingerprinting* molecular de Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, en inglés *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE); el cual se basa en la detección de polimorfismos entre secuencias de ADN que difieren en uno o más pares de bases. Los pequeños fragmentos (200-700 pb) se movilizan sobre un gradiente lineal desnaturalizante creciente en un gel de poliacrilamida (Helms, 1990).

### Preparación de geles y condiciones de electroforesis

Utilizando un generador de gradiente SG15 (Amersham Biosciences) y una bomba peristáltica DYNAMAX RP1 (Rainin) se prepararon geles de poliacrilamida 8% conteniendo un gradiente lineal de 35 a 60 % de desnaturalizante (donde el 100% de desnaturalizante contiene urea 7M y formamida 40% v/v). Luego se sembraron por calle en el gel 38 µl del producto de amplificación del dominio V3 del ADN que codifica para el

gen ribosomal 16S (200 pb) los que contenían 4 µl de loading buffer (6X) de Buffer Siembra (Biodynamics).

Las condiciones de electroforesis fueron a 60V (aproximadamente 18 mA) durante 16 h a 60°C en *buffer* TAE 1X. Los geles fueron teñidos con GelRed en TAE 1X durante 30 min, lavados en TAE 1X durante 10 min y visualizados en transiluminador UV LABNET (Biodynamics).

## **Análisis de la estructura y diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco**

### Análisis de imágenes y agrupamiento

La estructura de la comunidad de las BOA fue caracterizada por DGGE. El análisis se realizó por separado para cada muestreo ya que las muestras correspondientes fueron corridas en sendos geles. En el análisis se consideraron los tres niveles de fertilización nitrogenada por triplicado (repeticiones de campo) y la SR. Los perfiles DGGE fueron digitalizados y analizados con el *software* GELCOMPARE II versión 4.602 (Applied Maths). La posición y la intensidad de las bandas (previamente normalizadas) fueron volcadas en una matriz de bandas que fue utilizada como material de partida para el análisis de agrupamiento o conglomerados y el cálculo de diversidad de las muestras.

El análisis de conglomerados (AC) corresponde a una técnica de clasificación de la estadística multivariada en donde las muestras pueden ser agrupadas en base a características comunes. En este trabajo, se evaluó la similitud de la estructura de la comunidad de las BOA entre los distintos tratamientos teniendo en cuenta los perfiles de bandas de cada muestra. El AC se realizó con el *software* GELCOMPARE II mediante el coeficiente de correlación de Pearson a partir de los valores de cada banda en la curva densitométrica (intensidad de banda) utilizando el algoritmo de encadenamiento promedio o *Unweighted Pair-Goup Method with Arithmetic media* (UPGMA). El uso del coeficiente de correlación de Pearson (Pearson, 1926) es apropiado para el análisis de datos

multiestados cuantitativos y es recomendado como un coeficiente de similitud adecuado para el análisis de *fingerprints* complejos de ADN (Häne, *et al.*, 1993).

### Determinación de la diversidad

Los métodos de *fingerprinting* o perfiles de las comunidades como el DGGE, examinan simultáneamente múltiples miembros de la comunidad en múltiples muestras ambientales y estiman la diversidad microbiana debido a que representan una identificación tentativa de los miembros más abundantes (Kowalchuck *et al.*, 2006).

Para estimar la diversidad de la comunidad a partir de la matriz de intensidades de bandas del DGGE, cada banda en el gel es definida como un filotipo específico o especie y la intensidad de cada banda detectada es considerada la abundancia de ese filotipo específico (Escalante, 2007; Zheng *et al.*, 2008). Cada matriz de bandas se analizó con el programa PAST versión 2.17b (Hammer *et al.*, 2001). La diversidad fue estimada utilizando el índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) (Shannon y Weaver 1949) mediante la siguiente ecuación:

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln N_i/N \quad \text{Ec. 2.12}$$

Dónde:

$N_i$  es la abundancia del filotipo  $i$ ,  $N$  es el total de la abundancia de todos los filotipos en la muestra,  $S$  es el número de filotipos (Zheng *et al.*, 2008) y  $N_i/N$  es la probabilidad de importancia de cada filotipo o especie (Odum, 1969). De esta manera,  $H'$  toma en cuenta ambos componentes de diversidad: riqueza y equitatividad.

Finalmente las diferencias en el índice de Shannon para los distintos tratamientos fueron calculadas mediante un Modelo Lineal Mixto en el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014).

## Secuenciación y análisis filogenético

Para realizar una caracterización de las especies y/o géneros presentes bajo las situaciones de fertilización, las bandas más destacables (aparición e intensidad) en el DGGE del muestreo de presiembrera fueron aisladas y reamplificadas. Los productos de PCR se purificaron con kit comercial Wizard (Promega) y fueron secuenciados por electroforesis capilar por el servicio que brinda el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas existentes en la *GenBank database* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Para observar la similitud y relaciones evolutivas entre las secuencias estudiadas y aquellas de especies, géneros y/o clones existentes en la *GenBank database* del NCBI, se realizó primeramente un alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW incluido en el *software* BioEdit versión 7.2.3 (Hall, 1999). Luego, se construyó un árbol filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución Kimura 2 (Kimura *et al.*, 1980) del *software* Mega versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). La evaluación estadística de la topología obtenida se realizó mediante un análisis de *bootstrap* (100 réplicas). La elección de secuencias tipo fue basada en el trabajo de Ai *et al.* (2013) y el agrupamiento filogenético fue definido de acuerdo a Kowalchuk y Stephen (2001).

## Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos químicos y biológicos se utilizó el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014). Se aplicó un Modelo Lineal Mixto, tomando como efecto fijo los tratamientos de fertilización y como efectos aleatorios, los momentos de muestreo (presiembrera y postcosecha) y repeticiones de campo. Los muestreos se definieron como un factor aleatorio debido a que representan mediciones repetidas en el tiempo de la misma unidad experimental (parcela).

Cuando existieron diferencias significativas en las variables medidas se realizó la prueba de comparación de medias mediante LSD Fisher con significancias del 5%.

Las correlaciones entre las variables químicas y biológicas se obtuvieron mediante el Índice de Pearson. Para garantizar la independencia de los datos, las correlaciones fueron realizadas en cada muestreo por separado. Las correlaciones entre las variables químicas y biológicas se obtuvieron mediante el Índice de Pearson. Para garantizar la independencia de los datos, las correlaciones fueron realizadas en cada muestreo por separado. Se consideraron en la discusión las correlaciones consistentes en ambas fechas de muestreo y estadísticamente significativas, y aquellas significativas detectadas sólo en una de las fechas que podrían ser consecuencia del efecto del cultivo predecesor y/o cambio estacional sobre el comportamiento de las BOA. Además, el análisis de correlación de Pearson también fue aplicado para determinar la relación entre el pH y las poblaciones dominantes de BOA debido a la implicancia de esta variable ambiental sobre la comunidad de BOA.

### RESULTADOS

#### Propiedades químicas de rastrojos y suelo

##### Fuentes de nitrógeno orgánico y disponibilidad

La fertilización prolongada con urea afectó de distinta manera a las variables químicas del suelo y rastrojos estudiadas (Tabla 3.1). La cantidad y calidad de rastrojos fueron afectadas significativamente ( $p < 0,05$ ); con un 37 % más de rastrojos y un 60% más de N en los mismos tanto en B y C con respecto al tratamiento A. Además como consecuencia del mayor aporte de rastrojos, el aporte de C en los tratamientos fertilizados fue de un 64% mayor que en el testigo.

También la MOS incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) un 7% en los fertilizados, al igual que el NOS que fue un 10% mayor por la aplicación de urea en comparación al testigo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la fracción de MOP ni en su contenido de N; como así tampoco en la relación C/N de la MOP, MOS y rastrojos (Tabla 3.1).

Por otra parte, el Nan disminuyó a medida que se incrementó la dosis de urea aplicada, siendo significativas ( $p < 0,05$ ) sólo las diferencias entre la dosis mayor y el testigo. Se observa en la Tabla 3.1, un 5 y 16 % menos de N potencialmente disponible en B y C respectivamente comparados con A.

##### Acidez y contenido de nitrógeno inorgánico

En la Tabla 3.2, se observa que la fertilización con urea a largo plazo afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) al pH, contenidos de  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$  del suelo. Los valores



de pH fueron menores a dosis crecientes de fertilizante, presentando diferencias entre dosis, con disminuciones de 0,4 y 0,7 unidades de pH con las dosis de 90 y 165 N kg. ha<sup>-1</sup> respectivamente en comparación al tratamiento A sin urea.

Por otra parte, el contenido de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue un 22% mayor en el tratamiento con 90 N kg. ha<sup>-1</sup> con respecto al testigo; mientras que el tratamiento de reposición o de mayor dosis no se diferenció de ambos. Es importante destacar que el test de Pearson reveló una correlación negativa y significativa ( $R^2 = -0,79$ ;  $p = 0,01$ ); entre el contenido de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el pH sólo presiembra.

En cuanto al contenido de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el tratamiento de mayor dosis presentó un 27% más que el testigo, el que a su vez no se diferenció significativamente del tratamiento con dosis media o de uso del productor.

**Tabla 3.1** Valores medios entre muestreos de cantidad y calidad de rastrojos de cosecha, MOP (Materia orgánica particulada), MOS (Materia orgánica del suelo) y Nan (Nitrógeno anaeróbico) bajo los tratamientos: A (Sin N); B (90 N kg. ha<sup>-1</sup>) y C (165 N Kg. ha<sup>-1</sup>). SR: Situación de Referencia que corresponde a una Pastura Natural. Los valores fueron estimados por Modelo Lineal Mixto considerando a los muestreos como un factor aleatorio.

TRAT.	Rastrojos			MOP			MOS			Nan	Rastrojos	MOP	MOS
	Cant.	C	N	Fracción	C	N	Cant.	C	N	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	C/N		
	(Mg.ha <sup>-1</sup> )									(mg. kg <sup>-1</sup> s)			
A	5,97 <sup>b</sup>	1,70 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	9,62 <sup>a</sup>	1,96 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	34,08 <sup>b</sup>	19,77 <sup>b</sup>	1,83 <sup>b</sup>	53,98 <sup>a</sup>	41,2 <sup>a</sup>	14,6 <sup>a</sup>	10,7 <sup>a</sup>
B	8,06 <sup>a</sup>	2,65 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	10,55 <sup>a</sup>	2,21 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	36,44 <sup>a</sup>	21,14 <sup>a</sup>	2,01 <sup>a</sup>	51,24 <sup>ab</sup>	37,3 <sup>a</sup>	14,5 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>
C	8,30 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	9,51 <sup>a</sup>	2,06 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	36,46 <sup>a</sup>	21,15 <sup>a</sup>	2,02 <sup>a</sup>	46,55 <sup>b</sup>	38,1 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	10,3 <sup>a</sup>
<i>P valor</i>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>	NS	NS	NS	<b>0,046</b>	<b>0,046</b>	<b>0,012</b>	<b>0,029</b>	NS	NS	NS
SR	7,31	2,12	0,12	17,97	4,09	0,28	48,36	28,05	2,51	128,94	17,9	14,9	11,05

Letras distintas indican diferencias significativas (p< 0,05) según LSD de Fisher.

**Tabla 3.2** Valores medios entre muestreos de acidez (pH), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Nitrógeno de nitrato), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Nitrógeno de amonio) del suelo bajo los tratamientos: A (Sin N); B (90 N kg. ha<sup>-1</sup>) y C (165 N Kg. ha<sup>-1</sup>). SR: Situación de Referencia que corresponde a una Pastura Natural. Los valores fueron estimados por Modelo Lineal Mixto considerando a los muestreos como un factor aleatorio.

TRAT.	pH	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
	-	(mg. kg <sup>-1</sup> s s)	
A	5,83 <sup>a</sup>	11,48 <sup>b</sup>	2,35 <sup>b</sup>
B	5,43 <sup>b</sup>	12,59 <sup>b</sup>	3,02 <sup>a</sup>
C	5,16 <sup>c</sup>	15,85 <sup>a</sup>	2,68 <sup>ab</sup>
<i>P</i> <i>valor</i>	<0,0001	0,002	0,048
SR	6,13	12,02	15,32

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) según LSD de Fisher.

## Caracterización de la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco bajo los diferentes tratamientos de fertilización

### Abundancia, actividad y diversidad

En la Tabla 3.3 se observan las medias de abundancia, actividad y diversidad de BOA teniendo en cuenta los valores determinados en ambos muestreos (MLM). La abundancia de las bacterias oxidantes del amoníaco fue afectada significativamente ( $p < 0,05$ ) con la aplicación de urea aunque no hubo diferencias entre los tratamientos fertilizados con 90 y 165 N kg. ha<sup>-1</sup>. El NMP de BOA incrementó un 12 % en el tratamiento B y un 10 % en el C con respecto al testigo A. El índice de diversidad, también mostró cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en respuesta a la fertilización; y al igual que en la abundancia, los tratamientos fertilizados que no se diferenciaron entre sí, presentaron mayor diversidad de BOA con respecto al testigo (Tabla 3.3).

Por otro lado, el análisis del PNS indica que existe una tendencia decreciente en la actividad potencial conforme aumenta la dosis de urea que no resultó significativa.

**Tabla 3.3** Valores medios entre muestreos y error estándar de Abundancia, Diversidad (H') de las bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) y Potencial de nitrificación de suelo (PNS) en los diferentes tratamientos de fertilización y SR (Situación de Referencia). Los valores fueron estimados por Modelo Lineal Mixto considerando a los muestreos como un factor aleatorio.

TRAT.	Abundancia	PNS	H'
	(log <sub>10</sub> n° bact.g <sup>-1</sup> )	(mg. N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> kg <sup>-1</sup> d)	-
A	2,65 ± 0,09 <b>b</b>	7,64 ± 1,56	2,74 ± 0,06 <b>b</b>
B	3,01 ± 0,09 <b>a</b>	6,52 ± 0,9	2,84 ± 0,04 <b>a</b>
C	2,96 ± 0,09 <b>a</b>	6,12 ± 0,72	2,83 ± 0,04 <b>a</b>
<b>P valor</b>	<b>&lt;0,0001</b>	NS	<b>&lt;0,0001</b>
SR	3,03 ± 0,22	7,56 ± 0,12	2,58 ± 0,22

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según LSD de Fisher.

## Relaciones entre la comunidad de oxidantes de amoníaco y las propiedades químicas del suelo

El coeficiente de Pearson (Tabla 3.4) mostró que la abundancia correlacionó positiva y significativamente con los rastros en presembrado, con el N-MOP y fracción MOS y su contenido de N en postcosecha, pero no se detectaron correlaciones consistentes entre los muestreos para esta variable.

El PNS correlacionó positiva y significativamente con el pH del suelo sólo en presembrado. También en presembrado, el índice de diversidad de Shannon correlacionó positiva y significativamente con el contenido de  $\text{N-NH}_4^+$ , mientras que con el pH la relación fue significativamente negativa (Tabla 3.4). A diferencia de la abundancia,  $\text{H}^+$  correlacionó positiva y significativamente con la cantidad de MOP y su contenido de N en ambos muestreos, mientras que con la MOS sólo en postcosecha.

**Tabla 3.4** Matriz de correlación de Pearson entre Abundancia, Diversidad ( $H'$ ) de las bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) y Potencial de nitrificación de suelo (PNS) con los rastrojos y propiedades químicas del suelo, en un primer muestreo (presiembrado de maíz, año 2010) y segundo (postcosecha, año-2011), con  $n=9$ . Cant. rast.: Cantidad de rastrojos. Frac. MOP: Fracción de materia orgánica particulada. C/N: Relación C y N en los rastrojos, MOP y MOS: Materia orgánica del suelo. N MOS: Nitrógeno de la materia orgánica del suelo. Nan: Nitrógeno anaeróbico.  $N-NH_4^+$ : Nitrógeno de amonio.  $N-NO_3^-$ : Nitrógeno de nitrato.

	Cant. rast.	N rast.	C/N rast.	Frac. MOP	N MOP	C/N MOP	MOS	N MOS	C/N MOS	Nan	pH	$N-NH_4^+$	$N-NO_3^-$
<b>PRESIEMBRA</b>													
<b>Abundancia</b>	0,80*	0,52	0,23	0,64	0,59	-0,25	0,21	0,21	-0,39	0,45	-0,34	0,50	0,03
<b>PNS</b>	-0,35	-0,41	-0,12	-0,28	-0,38	0,09	-0,27	-0,27	0,44	0,42	0,80*	-0,34	-0,50
<b><math>H'</math></b>	0,59	0,65	-0,07	<b>0,71*</b>	<b>0,75*</b>	-0,61	0,44	0,44	-0,46	-0,02	-0,67*	0,71*	0,20
<b>POSTCOSECHA</b>													
<b>Abundancia</b>	0,48	0,46	-0,02	0,54	0,71*	-0,38	0,9*	0,9*	-0,09	0,29	-0,44	0,20	0,40
<b>PNS</b>	0,07	0,23	0,18	0,39	0,57	-0,53	0,58	0,58	-0,56	0,03	-0,47	0,39	0,58
<b><math>H'</math></b>	0,37	0,43	-0,39	<b>0,87*</b>	<b>0,89*</b>	-0,41	0,79*	0,79*	0,27	0,53	-0,001	0,08	-0,35

Los números con \* son las correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) y en negrita aquellas consistentes entre muestreos.

## Estructura de la comunidad

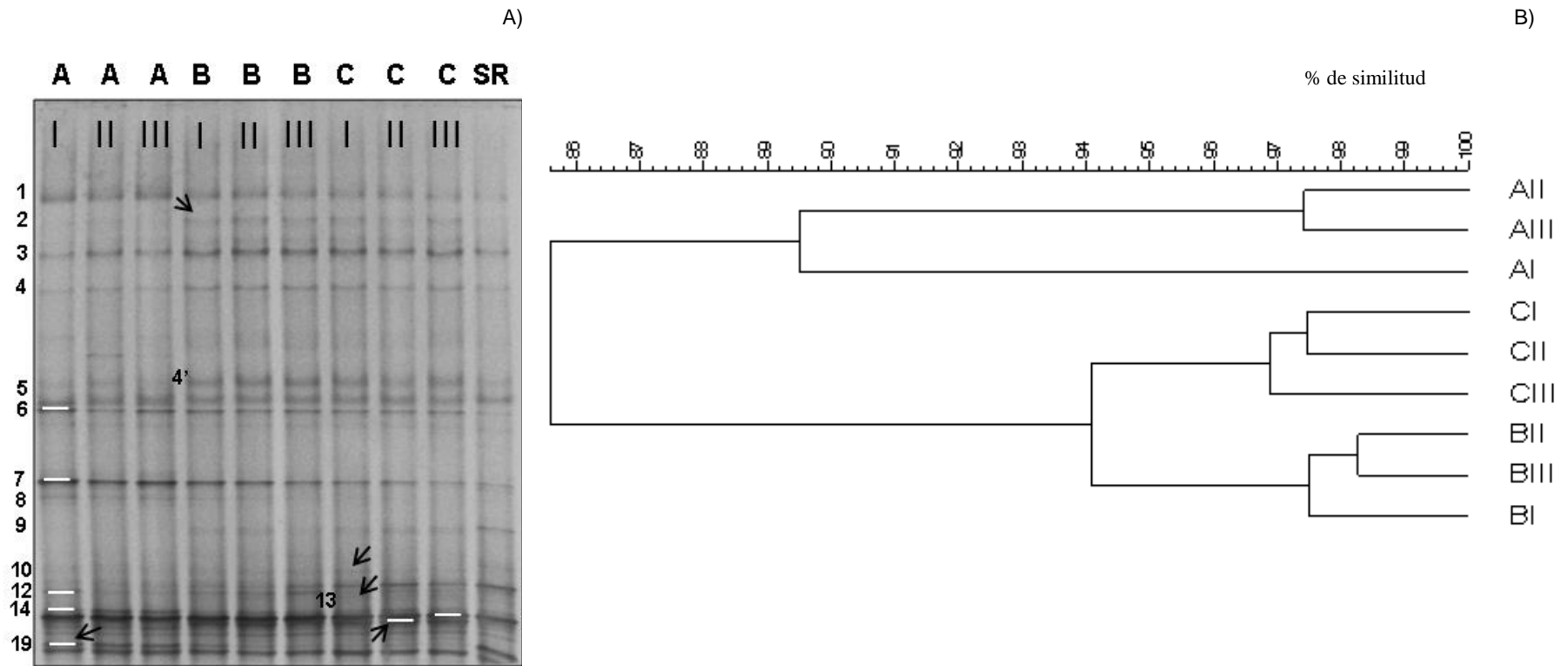
La estructura de la comunidad de las BOA en el suelo fue caracterizada mediante DGGE para cada muestreo ya que las muestras correspondientes fueron corridas en sendos geles. El análisis de los triplicados por tratamiento muestra una buena reproducibilidad de los perfiles de bandas.

Los perfiles DGGE de las BOA variaron entre tratamientos tanto en presiembra como en postcosecha de maíz (Figs. 3.1 A y 3.2 A respectivamente).

En presiembra, la fertilización provocó un aumento en la riqueza e intensidad de bandas del DGGE. Las bandas 2, 10 11 fueron exclusivas de los tratamientos con fertilización; mientras que dos bandas (8 y 14) fueron propias del testigo. Adicionalmente, se detectaron diferencias en la intensidad de algunas bandas entre los tratamientos y el testigo. Así, las bandas 3, 4, 4', 12 y 16 fueron más intensas en B y C, mientras que las bandas 7 y 19 presentaron un comportamiento opuesto. (Fig. 3.1 A). Por otra parte, el test de Pearson reveló correlaciones significativas negativas entre las bandas 2, 10, 13 y 16 con el pH ( $R^2 = -0,82$ ;  $p = 0,004$ ;  $R^2 = -0,87$ ;  $p = 0,001$ ;  $R^2 = -0,89$ ;  $p = 0,0005$ ;  $R^2 = -0,76$ ;  $p = 0,01$ , respectivamente); mientras que con la banda 19, la correlación con el pH fue positiva ( $R^2 = 0,91$ ;  $p = 0,0001$ ) indicando que a medida que disminuye el pH también lo hace esta población de BOA.

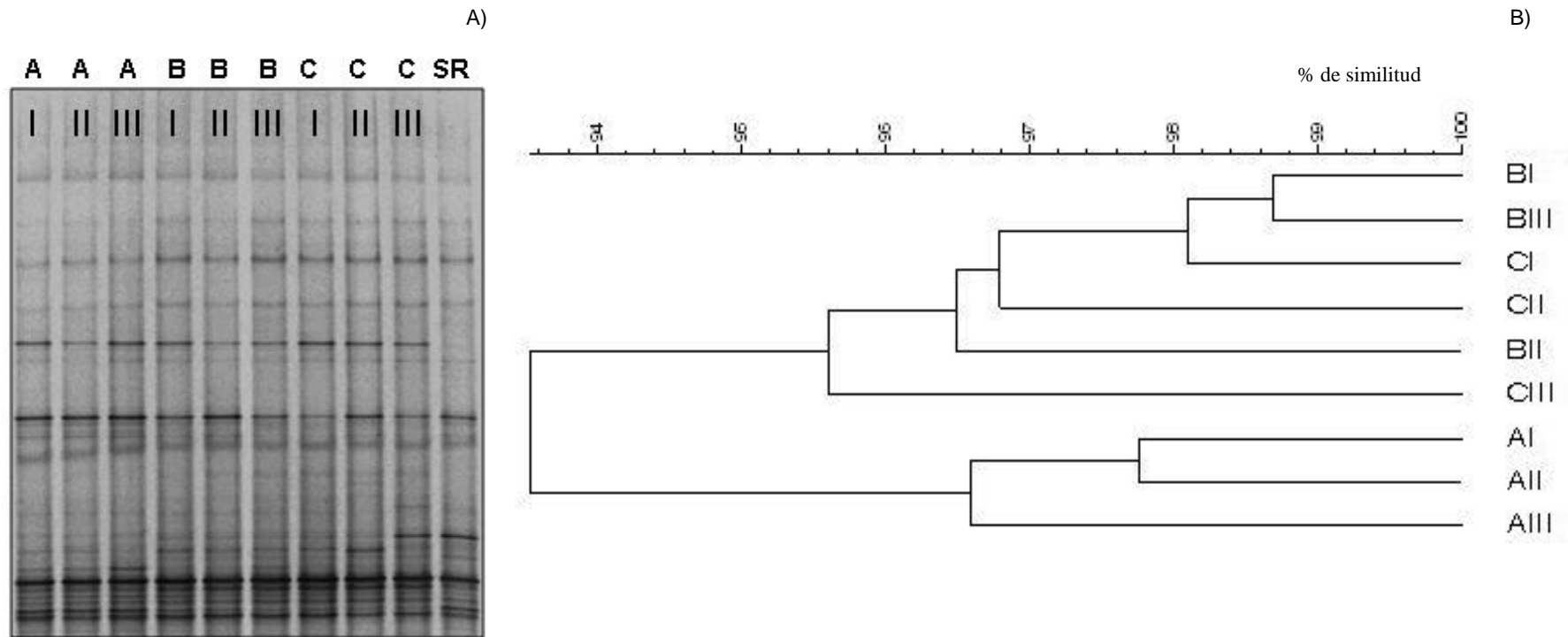
En postcosecha, se detectó menor variación en los perfiles entre los tratamientos evaluados (Fig. 3.2 A) mostrando que la composición de la comunidad de BOA fue muy similar en todos los tratamientos.

Los resultados son confirmados por los dendrogramas de similitud del AC (Fig. 3.1 B y 3.2 B). En presiembra, el tratamiento A se separó de B y C a un 85,1% de similitud. A su vez dentro de los tratamientos fertilizados hubo discriminación entre dosis de fertilización a un 93,8 %. Por otra parte, en postcosecha la estructura de las BOA presentó mayor similitud (93,5%) entre los patrones con respecto a presiembra, sin embargo, la variación estructural se mantuvo mostrando la separación de B y C del tratamiento A.



**Fig. 3.1** DGGE de BOA correspondiente a un primer muestreo (presiembr de maíz, año 2010) para los diferentes tratamientos de fertilización A: Sin N; B y C: con 90 y 165 Kg N ha<sup>-1</sup> respectivamente y SR: Situación de Referencia (A); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson) expresado en porcentaje. (B). Las líneas blancas señalan las bandas secuenciadas y las flechas negras aquellas que correlacionan con el pH. Los números romanos representan las tres repeticiones de campo para cada tratamiento.





**Figura 3.2** DGGE de BOA correspondiente a un segundo muestreo (postcosecha de maíz, año 2011) para los diferentes tratamientos de fertilización A: Sin N; B y C: con 90 y 165 Kg N ha<sup>-1</sup> respectivamente y SR: Situación de Referencia (A); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson) expresado en porcentaje. (B). Los números romanos representan las tres repeticiones de campo para cada tratamiento.

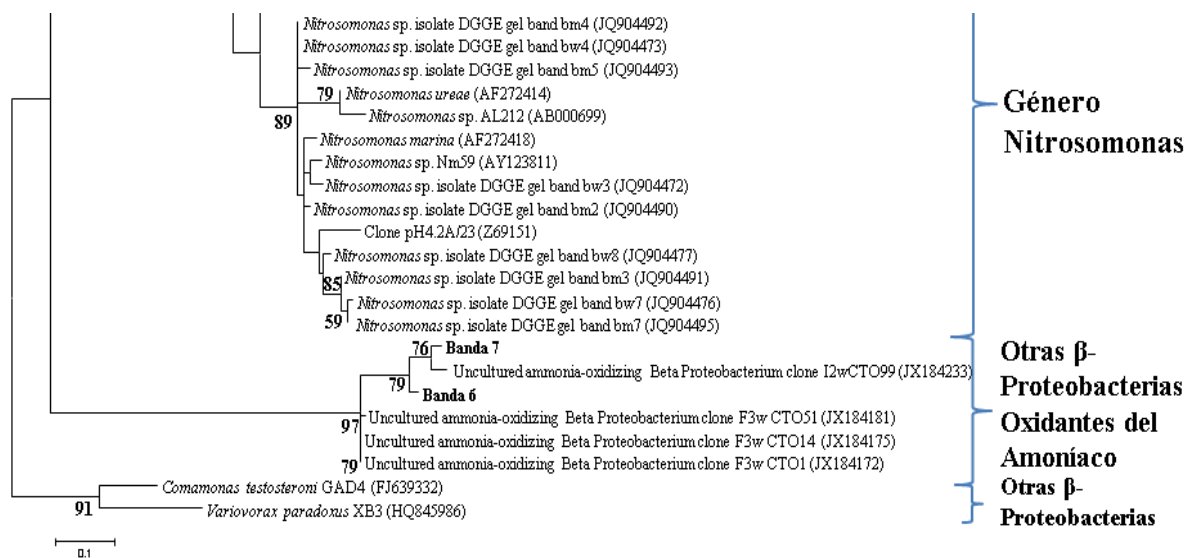
## Búsqueda de secuencias y árbol filogenético

Las bandas 6, 7, 12, 14, 15, 16 y 19 fueron seleccionadas del DGGE (Fig. 3.1A) y secuenciadas para determinar su identidad y relaciones filogenéticas. La comparación de sus secuencias con la base de datos GenBank mediante la utilización de la herramienta BLASTN indicó que la mayoría de las bandas analizadas presentaron elevados porcentajes de identidad (95 y 98%) con cepas de *Nitrospira tenuis* y *Nitrospira multiformis* (Tabla 3.5), a la vez que se afiliaron filogenéticamente con el linaje del Grupo 3 de *Nitrospira* predominante en suelos agrícolas (Fig. 3.3). Dos de las secuencias fueron afines a clones de  $\beta$ -Proteobacterias oxidantes del amoníaco no cultivables aislados de muestras de agua dulce por Sow *et al.* (2014). Los agrupamientos fueron respaldados por valores de bootstrap superiores al 50%. No se detectaron en este estudio afiliaciones con el género *Nitrosomonas*.

**Tabla 3.5** Bandas de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA) recortadas a partir de electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), secuencias conocidas de mayor similitud en el Gen Bank, porcentaje de similitud y origen de las mismas.

<b>Banda</b>	<b>Coincidencia más cercana</b>	<b>% Similitud (n° pb similar/pb totales)</b>	<b>Origen</b>
6	Clon de B Proteobacteria oxidante de amoníaco no cultivable (JX184181)	96 (184/191)	Estanques de agua dulce de historia minera
7	Clon de B Proteobacteria oxidante de amoníaco no cultivable (JX184233)	96 (183/190)	
12	<i>Nitrospira tenuis</i> cepa Nv1(104816)	96 (182/190)	Suelos agrícolas
	<i>Nitrospira multifomis</i> cepa ATCC 25196 (074736)	95 (181/190)	
14	<i>Nitrospira tenuis</i> cepa Nv1(104816)	96 (182/190)	
	<i>Nitrospira multifomis</i> cepa NL13 (115148)	95 (181/190)	
15	<i>Nitrospira tenuis</i> cepa Nv1(104816)	98 (186/190)	
	<i>Nitrospira multifomis</i> cepa ATCC 25196 (074736)	97 (185/190)	
16	<i>Nitrospira tenuis</i> cepa Nv1(104816)	97 (193/200)	
	<i>Nitrospira multifomis</i> cepa NL13 (115148)	96 (192/200)	
19	<i>Nitrospira tenuis</i> cepa Nv1(104816)	98 (187/190)	
	<i>Nitrospira multifomis</i> cepa ATCC 25196 (074736)	97 (186/190)	





**Fig. 3.3 Continuación** Árbol filogenético de las secuencias parciales del ADNr 16S de bacterias oxidantes del amoníaco (BOA), correspondientes a las bandas seleccionadas del DGGE y las secuencias con mayor similitud obtenidas de GenBank. Las secuencias correspondientes a este estudio se muestran en negrita. La escala indica % de sustituciones. Los valores *bootstrap* se muestran en los nodos.

### DISCUSIÓN

#### **Efecto de la aplicación de urea sobre los rastrojos de cosecha y aporte de nitrógeno**

La fertilización a largo plazo con urea incrementó la cantidad de rastrojos y por lo tanto el aporte de C, a la vez que aumentó la concentración N en los mismos. Esto es esperable debido a que, la aplicación de fertilizantes nitrogenados aumenta la biomasa de plantas por su incidencia en el rendimiento, determinando un mayor volumen de rastrojos que retornan al suelo (Studdert y Echeverría, 2000). Históricamente en el ensayo estudiado, los rendimientos de trigo y maíz en los tratamientos que reciben fertilización son mayores al testigo, lo que explica la mayor cantidad de rastrojos (Masiero *et al.*, 2006). Además cuanto más N disponible hay en el suelo al inicio del ciclo de un cultivo, mayor es la cantidad de N absorbido durante el período de crecimiento de la planta. En consecuencia, a medida que hay más N disponible en el suelo (suelo + fertilizante) aumenta la absorción del nutriente (Álvarez y Steinbach, 2010), determinando una mayor concentración de N en los rastrojos provenientes de los tratamientos fertilizados.

También Soto *et al.* (2004) observaron que el efecto de la aplicación de urea en la producción de materia seca de rastrojo de maíz fue significativamente superior a los tratamientos sin N, y a dosis crecientes de N encontraron mayor contenido de proteínas en los rastrojos, al igual que Cox *et al.* (1993), los que además obtuvieron un aumento lineal en la producción de rastrojos con un rango de dosis crecientes de N en maíz.

## **Efecto sobre la materia orgánica del suelo, su fracción particulada y disponibilidad de nitrógeno**

Tanto la MOS como su contenido de N aumentaron en los tratamientos fertilizados comparados con el testigo, debido al mayor retorno de rastrojos por fertilización (Gregorich *et al.*, 1996) durante el manejo a largo plazo. Halvorson *et al.* (1999) observó una relación positiva entre el contenido de N de los rastrojos y el N del suelo en 0,75 cm de profundidad luego de la aplicación de N durante 10 años.

El incremento en el contenido de MOS expresada como COS o COT (carbono orgánico total) debido a la fertilización nitrogenada, ha sido registrado en diferentes experimentos de larga duración (Álvarez, 2005) y en suelos similares a los de este estudio (Studdert y Echeverría, 2000). Liebig *et al.*, (2002) reportaron que la fertilización con 90 y 180 kg ha<sup>-1</sup> de N como urea incrementó el contenido de COS en 1,0 Mg .ha<sup>-1</sup> y 1,4 Mg .ha<sup>-1</sup>, respectivamente, y su contenido de N en comparación con un testigo, luego de 16 años de rotaciones con maíz en un suelo Argiudol típico. También Gregorutti *et al.* (2014) observaron que la fertilización con urea luego de 14 años de aplicación, afectó el NOS expresado como NT (Nitrógeno Total) con diferencias significativas entre la dosis de 138 kg.ha<sup>-1</sup> de N como urea y un testigo. Por su parte, Cazorla (2012) en el mismo ensayo y tratamientos evaluados en este trabajo, entre los años 2006 y 2007, encontró que la fertilización a nivel de reposición de nutrientes (trat. C) produjo incrementos en el contenido de COT en los 0-5 cm de profundidad luego de 13 años de manejo. Sin embargo, otros trabajos realizados en suelos Argiudoles con elevado contenido de MOS, no han registrado cambios significativos en el COT a distintas profundidades a pesar de un aumento en el retorno de rastrojos por fertilización a largo plazo (Domínguez *et al.*, 2004; Diovisalvi *et al.*, 2008; Divito *et al.*, 2011; Wyngaard *et al.*, 2012). Por lo tanto, los cambios en la MOS debido a la fertilización con N dependerán de varios factores como dosis de N, rotación de cultivos, el medio ambiente y el tipo de suelo evaluado (Álvarez, 2005).

La fracción de MOP y su contenido de C y N no cambiaron con la aplicación de urea a pesar del mayor aporte de rastrojos por fertilización luego de 12 años de manejo. Este

resultado fue similar a lo observado por otros trabajos realizados en ensayos de larga duración sobre suelos Argiudoles (Diovisalvi *et al.*, 2008; Wyngaard *et al.*, 2012 y Gregorutti *et al.*, 2014) que no detectaron diferencias importantes en la fracción particulada medida como COP ni en su contenido de N entre tratamientos con urea y testigo a diferentes profundidades. A pesar de que la MOP es considerada un indicador que responde rápidamente a los cambios en el *input* de rastrojos (Galantini y Rosell, 2006), ha sido demostrado que su sensibilidad es mucho más notoria en los primeros 5 cm del suelo (Studdert *et al.*, 2008). Por lo tanto, en este trabajo una de las causas que respondería a la falta de cambios en dicha fracción sería el efecto dilución determinado por la mayor profundidad de muestreo utilizada. Otra posible causa por la cual no se detectaron cambios en la fracción particulada podría ser por la calidad o disponibilidad de N de los rastrojos.

La relación C/N de los rastrojos entre los tratamientos no cambió y fue superior a 37 (Tabla 3.1), lo que estaría indicando la inmovilización de N por los microorganismos. Por lo tanto, esta condición pudo afectar el aporte de N hacia la fracción lábil, debido a que predomina la inmovilización cuando el material orgánico presenta una relación C/N=25 o mayor (Tisdale y Nelson, 1991; Ciarlo y Palma, 2011).

Los resultados obtenidos evidencian que la fertilización nitrogenada es una práctica importante para aumentar el aporte de rastrojos, pero demuestran lo observado por Divito *et al.* (2011), que en condiciones de manejo con un elevado retorno de rastrojos en suelos Argiudoles, los beneficios sobre la fracción particulada de la MOS podrían no ser evidentes.

El Nan que representa una estimación del N potencialmente mineralizable del suelo proveniente principalmente de la MOP (Echeverría *et al.*, 2000; Fabrizzi *et al.*, 2003) cambió entre los tratamientos evaluados. En coincidencia con estudios previos de ensayos con fertilización nitrogenada a largo plazo y en suelos similares al estudiado (Genovese *et al.*, 2009; Divito *et al.*, 2011 y Gregorutti *et al.*, 2014), los tratamientos con urea generaron una disminución significativa del Nan. Gregorutti *et al.* (2014) encontró luego de 15 años de fertilización, que los valores de Nan eran menores a dosis de N como urea de 138 y 286



kg ha<sup>-1</sup> con respecto a una dosis de N de 69 kg. ha<sup>-1</sup> y el testigo. Este efecto se atribuye a un aumento en la velocidad de mineralización de la MOP como consecuencia de la aplicación de N (Galantini *et al.*, 2008). En este estudio, el aumento en la velocidad de mineralización de la MOP se puede apreciar en la reducción de la misma en el tratamiento de mayor dosis de urea. El efecto *priming* de los fertilizantes sobre el suelo se menciona con frecuencia como el responsable de la disminución del N potencialmente mineralizable debido a que la aplicación de N aumenta el volumen de aportes de N orgánico y, como consecuencia, reduce el pool de N mineralizable del suelo (Kuzyakov *et al.*, 2000).

### **Efecto sobre la acidez del suelo**

El pH del suelo disminuyó con la aplicación prolongada de urea a dosis crecientes. La principal causa de esta acidificación es la producción de iones H<sup>+</sup> debido a la hidrólisis y oxidación de la urea, ya que por cada mol de urea oxidada a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se produce un mol de H<sup>+</sup> (Divito *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con datos locales (Lardone *et al.*, 2012) y con otras observaciones realizadas en el mismo tipo de suelo y pH estudiados. Fabrizzi *et al.* (1998) encontró una disminución de pH con el agregado de una dosis de urea similar a la de reposición con respecto a un testigo luego de 8 años de fertilización. Divito *et al.* (2011) observó disminuciones significativas de pH a dosis crecientes de urea luego de 13 años de manejo. Por su parte, Wyngaard *et al.* (2012) en un ensayo de rotaciones con 7 años de aplicación de urea en maíz, detectó que las parcelas sin aplicación de N (entre ellas el testigo) tenían mayores valores de pH que aquellas con historia de aplicación.

### **Efecto sobre los contenidos de amoníaco y nitrato del suelo**

Numerosos factores como la aplicación de N por fertilizantes, rastrojos de cultivos, MOS, microflora, contenido de arcilla y la composición de minerales arcillosos afectan la concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la solución del suelo (Nieder *et al.*, 2010). En este estudio, el incremento de N aportado quedó demostrado por el mayor contenido de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> detectado en las parcelas con aplicación de urea. El mismo resultado fue

observado por Chen *et al.* (2011) y Yu *et al.* (2010) en ensayos de larga duración. El aumento N mineral encontrado en los tratamientos fertilizados, podría derivar tanto del aporte del fertilizante, como así también del mayor aporte por mineralización de los rastrojos y MOS, producto del incremento en el rendimiento agrícola asociado a la fertilización (Diovisalvi *et al.*, 2008).

Por otra parte, la activa mineralización promovida por la aplicación de urea se puede notar no sólo por una disminución en el contenido de N mencionada anteriormente; sino que además por la mayor concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  detectada en el tratamiento de mayor dosis de N. La acumulación de  $\text{N-NO}_3^-$  por la aplicación prolongada de urea ha sido reportada en distintos tipos de suelo (He *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010) debido a que el suministro de N conjuntamente con aquel derivado de la mineralización de la MOS promueven la actividad nitrificante *in situ* (Tisdale y Nelson, 1991; Booth *et al.*, 2005).

### **Efecto sobre la abundancia, actividad y diversidad de las bacterias oxidantes del amoníaco**

La aplicación de urea incrementó la abundancia y diversidad de las BOA demostrando que el N aportado es un factor preponderante frente a la acidificación causada por la fertilización con urea. Los resultados concuerdan con datos bibliográficos de suelos con pH medianamente ácido y alcalino donde se observó mayor abundancia (Biederbeck *et al.* 1995; Chu *et al.* 2008; Shen *et al.* 2008) o un incremento en la diversidad de BOA (Chu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2013) al aplicar urea a largo plazo a pesar de la disminución en el pH edáfico.

La abundancia de BOA se asoció mediante correlaciones positivas y significativas a los rastrojos en presembrado y al N-MOP y fracción MOS y su contenido de N en postcosecha, al igual que la diversidad. Dichos resultados permiten suponer que bajo condiciones de mineralización de N dadas por el rastrojo de soja, las temperaturas y precipitaciones en presembrado, los residuos resultaron el principal aporte de sustrato a la

comunidad oxidante de amoníaco, mientras que, cuando el N se encontraba en baja disponibilidad por la inmovilización desde el rastrojo de maíz en postcosecha, el aporte provino de las formas orgánicas del suelo. Estos resultados manifiestan por un lado, lo descrito por Tisdale y Nelson (1991), que cuando el material orgánico en descomposición presenta una relación C/N alta, los microorganismos utilizan el N derivado de la mineralización de la MOS. Por el otro, demuestran la importancia de la relación C/N de los materiales orgánicos del suelo en los procesos de mineralización e inmovilización microbiana. Así los suelos con una baja relación C/N minimizan la inmovilización del N a la vez que favorecen la disponibilidad de N inorgánico derivado de la mineralización de las fuentes orgánicas (Bengtsson *et al.*, 2003).

Se detectaron dos correlaciones consistentes entre muestreos las cuales mostraron una relación positiva y significativa entre la diversidad de las BOA y la fracción de MOP así como también con su contenido de N, indicando que dicha fracción lábil de suelo podría actuar potencialmente como sustrato de la comunidad nitrificante. Jones *et al.* (2004) concluyeron que componentes de bajo peso molecular como los aminoácidos del pool orgánico lábil del suelo actúan como fuente de N para las bacterias nitrificantes autótroficas luego de observar acumulación gradual de nitratos en tres suelos agrícolas.

Si bien el diseño experimental del presente trabajo no permite asegurarlo, el hecho de que muchas correlaciones fueran detectadas en sólo uno de los muestreos podría ser consecuencia de los efectos producidos tanto por los cultivos predecesores y sus rastrojos como por cambios estacionales, ya que se considera que ambos factores tienen una importante influencia en el comportamiento de la comunidad de las BOA (Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2012; Bouskill *et al.*, 2011). En el mismo sentido, Wright *et al.* (2005) observaron una fuerte influencia de especies de plantas y residuos de cosecha sobre la diversidad microbiana del suelo en general.

Por otra parte, la ausencia de cambios significativos en el PNS en respuesta a la aplicación de urea coincide con las observaciones de otros trabajos en ensayos de larga duración (Chu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). Sin embargo, la actividad potencial mostró

una tendencia decreciente con el aumento en la dosis de fertilizante que podría estar relacionada con la acidificación del suelo. Dicho resultado se refleja en la correlación positiva y significativa detectada entre la actividad de las BOA y el pH en presiembra. Una posible explicación sería que la acidez creciente del suelo haya seleccionado especies tolerantes o acidofílicas. Es sabido que existen especies de BOA las cuales poseen ureasas intracelulares que les permite tomar urea directamente del medio, superando el inconveniente de la protonación del  $\text{NH}_3$  a pH bajo (Burton y Prosser, 2001). Esta capacidad les permite competir exitosamente en su ambiente, aunque podría implicar una menor velocidad de oxidación, dando lugar a un menor potencial de nitrificación en condiciones *in vitro* tal como ocurrió en este trabajo. Correlaciones similares fueron detectadas por Enwall *et al.*, (2007); He *et al.* (2007) y Wessen *et al.*, (2010) en suelos medianamente ácidos como consecuencia de la aplicación prolongada de fertilizantes minerales nitrogenados.

La disminución del pH afectó además del PNS a la diversidad de las BOA, mientras que no modificó su abundancia. Las correlaciones negativas y significativas observadas tanto para el índice de diversidad, como para la abundancia de algunas poblaciones de BOA con el pH, manifiestan la presencia de especies tolerantes a la acidez del suelo. En forma similar, la selección de distintos linajes de BOA a lo largo de un gradiente de pH fue observada por Nicol *et al.* (2008), y podría atribuirse según Pommerening-Röser y Koops (2005) a los diferentes pHs óptimos para el transporte de urea de las distintas poblaciones.

Los resultados obtenidos son apoyados por diversos autores (De Boer and Kowalchuck, 2001; Enwall *et al.*, 2007; Ward, 2008; Nicol *et al.*, 2008) que asocian la reducción de la actividad nitrificante y la aparición de poblaciones de BOA adaptadas a las condiciones de acidez debido a la protonación del  $\text{NH}_3$  en la solución del suelo.

En este estudio se observó que algunos linajes se vieron beneficiados con el incremento de la acidez, mientras que hubo por lo menos otro que resultó perjudicado por la disminución del pH, demostrando mayor sensibilidad a la acidificación. Las correlaciones entre los parámetros de la comunidad de BOA y el pH demuestran que el

mismo representa un componente clave en el comportamiento de estas comunidades debido a su influencia en la disponibilidad de  $\text{NH}_3$  en el suelo (Kowalchuck and Stephen, 2001; Nicol *et al.*, 2008), este efecto fue claramente detectado sólo en la estación de presembrado y es confirmado por la correlación negativa y significativa encontrada entre  $\text{NH}_4^+$  y pH.

### **Efecto sobre la estructura de la comunidad de las bacterias oxidantes del amoníaco**

La estructura de la comunidad de BOA en presembrado mostró un patrón de bandas más diverso en los tratamientos que recibieron urea con respecto al testigo; con mayor riqueza e intensidad de bandas. En postcosecha, estas diferencias fueron menores. Los aumentos en riqueza y abundancia de las BOA asociados a la aplicación de urea son coincidentes con lo observado en numerosos trabajos (Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2013) que utilizaron marcadores moleculares basados en genes 16S y amoA.

Mediante análisis de cluster pudieron confirmarse las diferencias observadas entre las comunidades, evidenciando la sensibilidad de la estructura de las BOA a los distintos regímenes de fertilización a largo plazo que ya había sido informada por otros autores (Shen *et al.* 2008; Yu *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2013). La magnitud de las diferencias detectadas pudo haber respondido a la época de muestreo. En presembrado, la diferencia entre los tratamientos fue más específica a nivel de dosis, mientras que en postcosecha la misma no fue evidente. Estas diferencias observadas entre muestreos, podrían ser explicadas por la disponibilidad diferencial de N. En presembrado (primavera) las condiciones de mayor mineralización de N podrían haber estimulado a cambios más evidentes en la composición de BOA que en postcosecha (otoño). Sin embargo, considerando las limitaciones del diseño experimental, no puede descartarse la influencia de las condiciones ambientales en estos resultados.

A pesar de las posibles causas de variabilidad que pueden existir entre los perfiles, la variación estructural se mantuvo, indicando que el efecto producido por la fertilización

prolongada con urea podría ser mayor al generado por otros factores ambientales. Un ejemplo de esto es lo observado por Ai *et al.* (2013) quien demostró que el efecto de la urea sobre la comunidad de BOA fue más importante que aquel producido por la zona rizosférica.

El análisis filogenético reveló la presencia de poblaciones relacionadas con  $\beta$ -Proteobacterias oxidantes del amonio no cultivables clasificadas como *Nitrosospira*, obtenidas en ambientes de agua dulce (Sow *et al.*, 2014), así como también poblaciones asociadas al Grupo 3 de *Nitrosospira* comúnmente detectado en ambientes terrestres, principalmente en suelos agrícolas (Kowalchuck y Stephen, 2001).

La búsqueda de homologías en la base de datos reveló elevados porcentajes de identidad de las secuencias analizadas con las correspondientes al género *Nitrosospira*, como *Nitrosospira tenuis* (Koops y Harms, 1985) antes llamada *Nitrosovibrio tenuis* (Harms *et al.*, 1976) y *Nitrosospira multiformis* (Norton *et al.*, 2008) y secuencias de clones no cultivables clasificadas como *Nitrosospira* (Sow *et al.*, 2014). Las secuencias analizadas compartieron elevada similitud. Según Wiens y Graham (2005), la escasa variabilidad genética es uno de los factores que determina que las especies filogenéticamente cercanas compartan pequeñas variaciones de aspecto ecológico (como tipo de hábitat, dieta, etc.). Esto explicaría la adaptación de las poblaciones analizadas en este estudio a diferentes pH.

La detección del género *Nitrosospira* y la ausencia de *Nitrosomonas* son consistentes con otras investigaciones (Kowalchuck *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010) que señalan la dominancia de *Nitrosospira* en suelos. Más allá de que algunos trabajos han encontrado que la aplicación de fertilizantes nitrogenados a largo plazo promueve la dominancia del Grupo 3 de *Nitrosospira* (He *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010), en este estudio las poblaciones afiliadas al Grupo 3 fueron detectadas también en el control sin aplicación de N. Esto confirma lo observado por Chu *et al.* (2007) en tratamientos con y sin aplicación de urea a largo plazo, y por Avrahami *et al.* (2003) que han encontrado dicho grupo tanto en suelos fertilizados como en controles sin aplicación de N, concluyendo que

no necesariamente es dominante en condiciones de elevada concentración de amonio, ya que puede contener miembros que son sensibles a elevados niveles de  $\text{NH}_4^+$  (Taylor *et al.*, 2012) como lo observado en este estudio.

La elevada versatilidad de las BOA pertenecientes al Grupo 3 (Avrahami *et al.*, 2003) se ve reflejada en su ubicuidad en distintos tipos de suelos (Fierer *et al.*, 2009). La presencia de poblaciones con elevada similitud a clones de *Nitrosospira* no cultivables obtenidos de estanques mineros (Sow *et al.*, 2014), estaría relacionada con esta característica general de las BOA (Hiorns *et al.*, 1995; Kowalchuck y Stephen, 2001).

### CONCLUSIONES

- La fertilización prolongada con urea aumentó el aporte de rastrojos e incrementó la materia orgánica del suelo, aunque no generó cambios significativos en la fracción particulada o lábil del suelo.
- La disminución del N potencialmente disponible de la materia orgánica particulada bajo fertilización nitrogenada y su relación con las BOA evidencian que el mismo podría representar un sustrato para los microorganismos nitrificantes.
- La acidez y el contenido de N inorgánico del suelo se incrementaron con el aumento de la dosis de urea aplicada.
- El manejo prolongado con urea a largo plazo en un suelo con buena capacidad amortiguadora representó una fuente de sustrato a partir del aporte de N, aumentando la abundancia y diversidad de las BOA. La actividad nitrificante potencial no reflejó estos cambios, sin embargo, se detectaron poblaciones de BOA tolerantes a las condiciones de acidificación.
- La estructura de la comunidad mostró cambios en respuesta a la fertilización, los que estuvieron condicionados por las características ambientales. Se detectaron mayormente miembros del Grupo 3 de *Nitrosospira* comunes en suelos agrícolas.

Los resultados demuestran que el manejo de fertilización con urea a largo plazo en un suelo Argiudol típico de Argentina no produjo efectos negativos sobre la comunidad de BOA, la que a su vez respondió con cambios en la abundancia y estructura demostrando su alta sensibilidad. El aprovechamiento de las BOA como potenciales indicadoras de la



calidad del suelo, permitirían futuros estudios que incluyan la caracterización de dicha comunidad en otros sistemas agrícolas.

De esta manera, se podrá adquirir un conocimiento más completo y global sobre el funcionamiento de estas comunidades claves del ciclo del N ya sea para mejorar el manejo de N en los sistemas agrícolas y/o agrícolas-ganaderos como así también conocer su disponibilidad para los cultivos en el marco de un manejo sustentable evitando posibles efectos negativos sobre el ambiente.

### BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A. 2002. La microbiología del suelo: su relación con la agricultura sustentable. En: Agroecología. El camino hacia una Agricultura Sustentable. Sarandón, S. J. (ed.). Ediciones Científicas Americanas. La Plata, Argentina, pp. 129-150.
- Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X., He, P. and Zhou, W. 2013. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 30-42.
- Aleem M. I. H., Hoch G. E. and Varner J.E. 1965. Water is the source of oxidant and reductant in bacterial chemosynthesis. *Proceedings National Academy of Sciences, USA*, 54: 869-873. En: Forte, A. 2006. Denitrifier and Nitrifier activities and N<sub>2</sub>O emissions of Fine and Coarse textured soils of a mediterranean Irrigated cropland in Southern Italy. *Tesi di Dottorato. Università Degli Studi Di Napoli Federico II Dipartimento Di Biologia Strutturale E Funzionale, Italy*, 175 pp.
- Alexander, M. 1965. Most probable number method for microbial populations. In: *Methods of soil analysis*. Black, C.A. (ed.). American Society of Agronomy, Madison. USA, pp. 1467-1472.
- Allison, S.M. and J.I. Prosser. 1993. Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 935-941. En: Burton, S.A.Q. and Prosser, J.I. 2001. Autotrophic Ammonia Oxidation at Low pH through Urea Hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2952-2957.
- Álvarez, R. 2005. A review of nitrogen fertilizer and conservation tillage effects on soil organic carbon storage. *Soil Use and Management* 21: 38-52.
- Álvarez, R. y Steinbach, H.S. 2010. Ciclado de Nitrógeno en Agroecosistemas. En: *Fertilidad de suelos. Caracterización y manejo en la Región Pampeana*. Álvarez, A., Rubio, G., Álvarez, C.R. y Lavado, R.S. (eds.). 1<sup>ra</sup> ed. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, pp. 231-269.
- Álvarez, R., Gutiérrez Boem, F. y Rubio, G. 2013. Recomendación de Fertilización. En: *Fertilización de cultivos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana*. Álvarez, R., Prystupa, P., Rodríguez, M y Álvarez, C. (eds.) 2<sup>da</sup> ed. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, pp. 101-115.
- Arce, E. y Díaz, R. 1996. El clima de Marcos Juárez. Valores medios y absolutos registrados en el período 1967-1994. *Información para extensión N° 30*. INTA EEA Marcos Juárez, 7 pp.
- Avrahami, S., Liesack, W. and Conrad, R. 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology* 5: 691-705.
- Balesdent, J., Chenub, C. and Balabane, M. 2000. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil & Tillage Research* 53: 215-230.
- Barraco, M. y Díaz-Zorita, M. 2005. Momento de fertilización nitrogenada de cultivos de maíz en Hapludoles Típicos. *Ciencia de Suelo* 23 (2): 197-203.

- Basile, A.L. 2009. Estructura y dinámica de comunidades bacterianas en sistemas de barros activados que degradan fenol. Tesis Doctorado. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina, 128 pp.
- Bateman, E.J. and Baggs, E.M. 2005. Contributions of nitrification and denitrification to N<sub>2</sub>O emissions from soils at different water filled pore space. *Biology and Fertility of Soils* 41: 379-388.
- Belser, L.W. and Mays, E.L. 1982. Use of nitrifier activity measurements to estimate the efficiency of viable nitrifier counts in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (4): 945-948.
- Bending, G.D., Turner, M.K. and Burns, I.G. 1998. Fate of nitrogen from crop residues as affected by biochemical quality and the microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 2055-2065. En: Bending, G.D. and Turner, M.K. 2009. Incorporation of nitrogen from crop residues into lihg-fraction organic matter in soils with contrasting management histories. *Biology and Fertility of Soils* 45: 281-287.
- Bending, G.D. and Turner, M.K. 1999. Interaction of biochemical quality and particle size of crop residues and its effect on the microbial biomass and nitrogen dynamics following incorporation into soil. *Biology and Fertility Soils* 29: 319-327.
- Bending, G.D. and Turner, M.K. 2009. Incorporation of nitrogen from crop residues into lihg-fraction organic matter in soils with contrasting management histories. *Biology and Fertility of Soils* 45: 281-287.
- Berg, P. and Rosswal, T. 1985. Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two swedish arable softs. *Biology and Fertility Soils* 1: 131-140.
- Biederbeck, V.O., Campbell, C.A., Ukrainetz, H., Curtin, D and Bouman, O.T. 1995. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with urea and anhydrous ammonia. *Canadian Journal Soil Science* 76: 7-14.
- Booth, M.S., Stark, J.M. and Edward R. 2005. Controls on Nitrogen cycling in terrestrial ecosystems: a synthetic analysis of literature data. *Ecological Monograph* 75: 139-157. En: Muruganandam, S. 2007. Soil Aggregate-Associated Microbial Community Structure and Nitrogen Transformations in Three Different Tillage Systems. Doctor Philosophy Soil Science. North Carolina State University, North Carolina, USA, 138 pp.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B. and Witzel, K. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environment. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 673-690.
- Bouskill, N.J., Eveillard, D., Mullan, G.O., Jackson, G.A. and Ward, B.B. 2011. Seasonal and annual reoccurrence in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacterial population structure. *Environmental Microbiology* 13(4): 872-886.
- Bremner, J. M. 1965. Inorganic Forms of Nitrogen. En: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E. and Clark, F.E. (eds.). American Society of Agronomy. Madison, USA, pp. 1179-1232.
- Brinkhoff, T. and Muyzer, G. 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3789-3796.

- Bruns, M.A., Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Prosser, J.I., Paul, E.A. 1999. Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2994-3000.
- Bünemann, E.K. and Mc Neill, A. 2004. Impact of fertilisers on soil biota. In: *Soil Biology in Agriculture. Proceedings of a workshop on current research into soil biology in agriculture*. Lines-Kelly, R. (ed.). NSW Department of Primary Industries, pp. 64-71.
- Burton, S.A.Q. and Prosser, J.I. 2001. Autotrophic Ammonia Oxidation at Low pH through Urea Hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2952-2957.
- Cabrera, M.L. 2007. Mineralización y Nitrificación: Procesos claves en el Ciclo del Nitrógeno. Simposio Fertilidad de Suelos. Rosario, Argentina, pp. 18.
- Calvó Perxas, L. 2005. A Study on the Phylogeny and the Ecology of the Ammonia Oxidizing Bacteria using a New Molecular Marker based on the Gene Amo B. Institut d' Ecología Aquàtica, Universitat de Girona, 229 pp.
- Cambardella, C.A., and Elliott, E.T. 1992. Particulate organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society American Journal* 56: 777-783.
- Campos, M., Campos Carlés, S., Garré, P., González Basteiro, V., Mayer, F., Micheloud, J., Pederiva, L. y Udaquiola, N. 2012. Mercado de Fertilizantes. La Argentina y el mundo. AACREA. Buenos Aires, Argentina. En: González Sanjuán, M.F., Grasso, A.A. y Bassi, J. 2013. Fertilizantes en Argentina, Análisis del Consumo. *Revista Fertilizar*. Publicado en internet, disponible en <http://www.fertilizar.org.ar>. Activo Julio 2016.
- Casado-Murillo N. and Abril, A. 2011. Crop residue contribution to N fertilization under long term no-till systems in the central semiarid region of Argentina. En: *Semi-arid Ecosystems: Agriculture, Water Supply and Vegetation*. Degenovín, K.M. (ed.). Nova Science Publishers, New York, pp. 63-82.
- Cazorla, C.R. 2012. Influencia de la fertilización y de los cultivos de cobertura en los contenidos de carbono orgánico, estabilidad de agregados y densidad aparente del suelo. Tesis de Magíster. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 92 pp.
- Chen, X., Zhang, L., Shen, J., Zhihong, X and He J. 2010. Soil type determines the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in flooded paddy soils. *Journal Soils Sediments* 10: 1510-1516.
- Chen, X., Zhang, L., Shen, J., Wei, W. and He J. 2011. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biology and Fertility Soils* 47: 323-331.
- Chien, S.H., Gearhart, M.M. and Collamer, D.J. 2008. The Effect of Different Ammonical Nitrogen Sources on Soil Acidification. *Soil Science* 173 (8): 544-551.
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X., Yagi, K., Hu, J. and Zhang, J. 2007. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 485-491.
- Chu, H., Fujii, T., Morimoto, S., Lin, X. and Kazuyuki, Y. 2008. Population size and specific nitrification potential of soil of ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1960-1963.
- Ciarlo, E.A. y Palma, M. 2011. Nitrógeno del suelo. En: *Edafología, bases y aplicaciones ambientales Argentinas*. Conti, M.E. y Giuffré, L. (eds.) 1<sup>ra</sup> ed. Editorial Facultad de Agronomía. Univ. Bs. As. Argentina, pp. 363-384.

- Copperi M.Z., Mandolesi, M.E., Cantamutto, M.A. y Ron, M.M. 2013. Efectividad comparativa de dos fuentes nitrogenadas para la fertilización del maíz. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 99-106.
- Costa, J.L., Massone, H, Martínez, D., Suero, E.E., Vidale, C.M. and Bedmara, F. 2002. Nitrate contamination of a rural aquifer and accumulation in the unsaturated zone. *Agricultural Water Management* 57: 33-47.
- Cox, W.J., Kalonge, S., Cherney, D.J.R. and Reid, W.S. 1993. Growth, yield and quality of forage maize under different nitrogen management practices. *Soil Science Society of America Agronomy Journal* 85(2): 341-347.
- Dalias, P., Anderson, J.M., Bottnera, P. and Coûteaux, M-M. 2002. Temperature responses of net nitrogen mineralization and nitrification in conifer forest soils incubated under standard laboratory conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 691-701. En: Cabrera, M.L. 2007. Mineralización y Nitrificación: Procesos claves en el Ciclo del Nitrógeno. Simposio Fertilidad de Suelos. Rosario, Argentina, pp. 18.
- Darwich, N.A. 2006. Nitrógeno: "Constructor de Proteínas". En: Manual de Fertilidad de Suelos y Uso de Fertilizantes. Darwich, N.A. (ed.). 3<sup>ra</sup> Ed. Fertilizar Asociación Civil. Mar del Plata, Argentina, pp. 61-87.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Diovisalvi, N.V., Studdert, G.A., Domínguez, G.F. and Eiza, M.J. 2008. Fracciones de carbono y nitrógeno orgánicos y nitrógeno anaeróbico bajo agricultura continua con dos sistemas de labranza. *Ciencia del suelo* 26 (1): 1-11.
- Divito, A.G., Sainz Rozas, H.R., Echeverría, H.E., Studdert, G.A. and Wyngaard, N. 2011. Long term nitrogen fertilization: Soil property changes in an Argentinean Pampasoil under no tillage. *Soil and Tillage Research* 114: 117-126.
- Domínguez, G.F., Studdert, G.A. y Echeverría, H.E. 2004. Efecto de los sistemas de labranza sobre la materia orgánica total y particulada en un Molisol de Balcarce. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Paraná, Entre Ríos, Argentina. En Actas: CD, 7 pp.
- Drury, C.F., Hart, S.C. and Xang, X.M. 2008. Nitrification Techniques for Soil. En: Soil sampling and methods of analysis. 2<sup>da</sup> Ed. Carter, M. R. and Gregorich, E. G. (eds.). Canadian Society of soil Science, CRC Press, Taylor & Francis Group. New York, United States of America, pp. 495-515.
- Echeverría H.E. y Bergonzi, R. 1995. Estimación de la mineralización de nitrógeno en suelos del sudeste bonaerense. *Boletín Técnico* N° 135. EEA INTA Balcarce. Balcarce, Buenos Aires, 15 pp.
- Echeverría, H.E., San Martín, N.F. y Bergonzi, R. 2000. Métodos rápidos de estimación de nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos. *Ciencia del Suelo* 18: 9-16.
- Echeverría, H.E. y Sainz Rozas, H. 2006. Nitrógeno. En: Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Echeverría, H. E. y García, F.O. (eds.). Ediciones Inta, Buenos Aires, Argentina, pp. 69-97.
- Echeverría, H.E. y Sainz Rozas, H. 2015. Nitrógeno. En: Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Echeverría, H. E. y García, F.O. (eds.). 2<sup>da</sup> Ed. Ediciones Inta, Buenos Aires, Argentina, pp. 189-228.
- Enwall, K., Nyberg, K., Bertilsson, S., Cederlund, H., Stenström, J. and Hallin, S. 2007. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial

- communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 106-115.
- Escalante, A.E. 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. (Comp.). Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 393-416.
- Fabrizzi, K., Picone, L., Berardo, A. y García, F. 1998. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en las propiedades químicas de un suelo Argiudol típico. *Ciencia del suelo* 16: 71-76.
- Fabrizzi, K.P., Morón, A. and García, F. 2003. Soil C and N organic fractions in degraded vs. non-degraded Mollisols in Argentina. *Soil Science Society of America Agronomy Journal* 67: 1831-1841.
- Fierer, N., Carney, K.M., Horner-Devine, M.C. and Megonigal, J.P. 2009. The Biogeography of Ammonia-Oxidizing Bacterial Communities in Soil. *Microbial Ecology* 58:435-445.
- Figuerola, E., Guerrero, L. y Erijman, L. 2010. Tamaño de las poblaciones de microorganismos oxidantes de amonio en suelos sometidos a diferentes prácticas agrícolas. XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, Santa Fé, Argentina. En: *Actas*: CD, 4 pp.
- Forte, A. 2006. Denitrifier and Nitrifier activities and N<sub>2</sub>O emissions of Fine and Coarse textured soils of a mediterranean Irrigated cropland in Southern Italy. *Tesi di Dottorato*. Università Degli Studi Di Napoli Federico II Dipartimento Di Biologia Strutturale E Funzionale, Italy, 175 pp.
- Fortuna, A., Harwood, R.R., Robertson, G.P., Fisk, J.W. and Paul, E.A. 2003. Seasonal changes in nitrification potential associated with application of N fertilizer and compost in maize systems of southwest Michigan. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 97: 285-293.
- Frioni, L. 2006. *Microbiología: Básica, ambiental y agrícola*. Publicaciones Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay, 464 pp.
- Galantini, J. and Rosell, R. 2006. Long-term fertilization effects on soil organic matter quality and dynamics under different production systems in semiarid Pampean soils. *Soil Tillage Research* 87: 72-79.
- Galantini, J.A., Iglesias, J., Landriscini, M., Suñer, L. y Minoldo, G. 2008. Calidad y dinámica de las fracciones orgánicas en sistemas naturales y cultivados. En: *Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina*. Galantini, J. A. (ed.). 1<sup>ra</sup>. Ed. Editorial UNS. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, pp. 71-95.
- Galantini, J.A. y Suñer, L. 2008. Soil organic matter fractions: analysis of Argentine soils. *Agriscientia* XXV (1): 41-55.
- Gans, J., Wolinsky, M. and Dunbar, J. 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* 309: 1387-1390. Publicado en internet, disponible en <http://science.sciencemag.org>. Activo Julio, 2016.
- García, F. y Fabrizio, K. 2001. Dinámica del nitrógeno en ecosistemas agrícolas: Efectos de la siembra directa. En: *Siembra directa en el Cono Sur*. Díaz Rossello, R. (Coord.). Montevideo, Uruguay, 448 pp.

- Gasparoni, J.C. 2008. Determinación de la material orgánica del suelo. En: Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina. Galantini, J.A. (ed.). 1<sup>ra</sup>. Ed. Editorial UNS. Bahía Blanca, Bs. As., Argentina, pp. 41-50.
- Ge, G., Li, Z., Fan, N., Chu, G., Hou, Z. and Liang, Y. 2010. Soil biological activity and their seasonal variations in response to long-term application of organic and inorganic fertilizers. *Plant Soil* 326: 31-44.
- Ge, Y., Zhang, J., Zhang, L., Yang, M. and He, J. 2008. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. *Journal Soils Sediments* 8 (1): 43-50.
- GELCOMPARE II version 4.602 (2005) of Applied Maths NV.
- Genovese, M.F., Echeverría, H.E., Studdert, G.A. y Sainz Rozas, H.R. 2009. Nitrógeno de amino-azúcares en suelo: calibración y relación con el nitrógeno incubado anaeróbico. *Ciencia del Suelo* 27: 225-236.
- Gianello, C. and Bremner, J. M. 1986. A simple chemical method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analyses* 17: 195-214.
- Gilgames. 2004. -Publicado en -internet,- disponible- en- <http://www.gilgames.com.au/ureaspec.html>. Activo Julio 2016.
- Glaser, K., Hackl, E., Inselsbacher, E., Strauss, J., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S. and Sessitsch, A. 2010. Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. *FEMS Microbiology Ecology* 74: 575-591.
- Golterman, H.L. 1991. Influence of FeS on denitrification in shallow waters. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 24: 3025-3028. En: Forte, A. 2006. Denitrifier and Nitrifier activities and N<sub>2</sub>O emissions of Fine and Coarse textured soils of a mediterranean Irrigated cropland in Southern Italy. Tesis de Doctorato. Università Degli Studi Di Napoli Federico II Dipartimento Di Biologia Strutturale E Funzionale, Italy, 175 pp.
- González, M., Marbán, L. y Conti, M. 2011. Reacción del suelo. En: Edafología, Bases y Aplicaciones Ambientales Argentinas. Conti, M. y Giuffrè, L. (eds.). 1<sup>ra</sup>. Ed. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires, Argentina, pp. 297-312.
- Gregorich, E.G., Ellert, B.H., Drury, C.F. and Liang, B.C. 1996. Fertilization effects on soil organic matter turnover and corn residue C storage. *Soil Science Society of America Journal* 60: 472-476.
- Gregorutti, V.C., Novelli, L.E., Melchiori, R.J.M., Ormaechea, M.V. y Caviglia, O.P. 2014. Nitrógeno incubado en anaerobiosis y su relación con el nitrógeno orgánico en diferentes fracciones. *Ciencia del Suelo* 32 (1): 41-51.
- Gudelj, V.J., Vallone, P.S., Galarza, C.M., Masiero, B.L., Gudelj, O.E. y Lorenzón, C. 2004. Momentos de aplicación de nitrógeno en siembra directa de maíz. XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Paraná, Entre Ríos. En: Actas: CD, 6 pp.
- Gutiérrez Boem, F.H. 2013. Fertilización del cultivo de soja. En: Fertilización en cultivos y pasturas. Diagnóstico y recomendación en la Región Pampeana. Álvarez, R., Prystupa, P., Rodríguez, M y Álvarez, C. (eds.) 2<sup>da</sup> ed. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, pp. 213-240.
- Ha, K.V., Marschner, P. and Bünemann, E.K. 2008. Dynamics of C, N, P and microbial community composition in particulate soil organic matter during residue decomposition. *Plant Soil* 303: 253-264.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Halvorson, A.D., Reule, C.A., Follett, R.F. 1999. Nitrogen fertilization effects on soil carbon and nitrogen in a dryland cropping systems. *Soil Science Society American Journal* 63: 912-917.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. 2001. PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electronica* 4(1): 9 pp.
- Häne, B.G., Jäger, K., and Drexler, H.G. 1993. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis* 14: 967-972.
- Harms, H., Koops, H.P. and Wehrmann, H. 1976. An Ammonia-Oxidizing Bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov. gen. nov. sp. *Archives Microbiology* 108: 105-111.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M. and Di, H.J. 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing Archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology* 9 (9): 2364-2374.
- Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., Mc Carthy, A.L. and Saunders, J.R. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology* 139: 1147-1153.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.M. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial Ecology* 35: 1-35.
- Helms, C. 1990. Method: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Publicado en internet, disponible en [http://hdklab.wustl.edu/lab\\_manual/dgge/dgge1.html](http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/dgge/dgge1.html). Activo Diciembre 2011.
- Hiorns, W.D., Hastings, R.C., Head, I.M., Mc Carthy, A.J., Saunders, J.R., Pickup, R.W. and Hall, G.H. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrosospira* in the environment. *Microbiology* 141: 2793-2800.
- Hirsch, P.R., Mauchline, T.H. and Clark, I.M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 878-887.
- INTA, 1978. Carta de Suelos de la República Argentina. Hoja 3363-17. Marcos Juárez. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 86 pp.
- IRAM (Instituto de Normalización), 1999. Norma 29410. Determinación del pH.
- IRAM (Instituto de Normalización), 2009. Norma 29571-2. Determinación de Carbono orgánico oxidable por escala semi micro Kjeldahl.
- IRAM (Instituto de Normalización), 2011. Norma 29572. Determinación de Nitrógeno por el método Kjeldahl modificado.
- Iturri, L.A., Buschiazzo, D.E. y Díaz-Zorita, M. 2010. Acidificación de Suelos Argentinos. XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, Argentina. En Actas: CD, 5 pp.
- Jones, D.L. and Kielland, K. 2002. Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soil. *Soil Biology Biochemistry* 34: 209-219.



- Jones, D.L., Shannon, D., Murphy, D.V. and Farrar, J. 2004. Role of dissolved organic matter (DON) in soil N cycling in grassland soils. *Soil Biology Biochemistry* 36: 749-756.
- Kamaa, M., Mburu, H., Blanchart, E., Chibole, L., Chotte, J., Kirunja, C. and Lesueur, D. 2011. Effects of organic and inorganic fertilization on soil bacterial and fungal microbial diversity in the Kabete long-term trial, Kenya. *Biology and Fertility Soils* 47: 315-321.
- Keeney, D.R. 1982. Nitrogen Availability Indices. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Page, A. L. *et al.*, (eds.). Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA, pp. 711-733.
- Khonje, D.J., Varsa, E.C. and Klubek, B. 1989. The acidulation effects of nitrogenous fertilizers on selected chemical and microbiological properties of soil. *Community Soil Science and Plant Analysis* 20: 1377-1395.
- Killham, K. 1990. Nitrification in coniferous forest soils. *Plant and Soil* 128: 31-44. En: Kurola, J. 2006. Nitrification and autotrophic ammonia-oxidising bacteria in soil. En: *Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation*. Yliopistopaino, University of Helsinki, pp. 15-20.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Koops, H.P. and Harms, H. 1985. Deoxyribonucleic acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology* 141: 214-218.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., De Boer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1489-1497.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R. and Woldendorp, J.W. 2000. Changes in the community structure of ammonia-oxidising bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environmental Microbiology* 2: 99-110.
- Kowalchuk, G.A. and Stephen, J.R. 2001. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review Microbiology* 55: 485-429.
- Kowalchuk, G.A., Drigo, B., Yergeau, E. and van Veen, J.A. 2006. Assessing Bacterial and Fungal Community Structure in Soil Using Ribosomal RNA and Other Structural Gene Markers. In: *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Kowalchuk, G.A and Smalla, K. (eds.). Springer Berlin Heidelberg. New York, pp. 160-188.
- Kurola, J. 2006. Nitrification and autotrophic ammonia-oxidising bacteria in soil. En: *Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation*. Yliopistopaino, University of Helsinki, pp. 15-20.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K. and Stahr, K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1485-1498.
- Lacasta, C., Benítez, M., Maire, N. y Meco, R. 2006. Efecto de la textura del suelo sobre diferentes parámetros bioquímicos. VII Congreso SEAE Zaragoza. Publicado en internet, disponible en <http://www.agroecología.net/>. Activo Julio 2016.

- Lardone, A.V., Cazorla, C. y Galarza, C. 2012. Fertilización en el sud-este de Córdoba: Rendimientos y efectos sobre algunas propiedades edáficas. Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata, Argentina. En: Actas: CD, 4 pp.
- Lavado, R.S. 2010. La fertilidad, sus características y la utilización de fertilizantes. En: Álvarez, R; G Rubio; CR Álvarez y RS Lavado (eds.). Fertilidad de Suelos. Caracterización y Manejo en la Región Pampeana. Ed. Facultad de Agronomía, UBA, Argentina, pp. 1-8.
- Lavado, R.S. y Steinbach, H.S. 2010. Principales rasgos de la agricultura pampeana. En: Álvarez, R; G Rubio; CR Álvarez y RS Lavado (eds.). Fertilidad de Suelos. Caracterización y Manejo en la Región Pampeana. Ed. Facultad de Agronomía, UBA, Argentina, pp. 9-19.
- Liebig, M.A., Varvel, G.E., Doran, J.W. and Wienhold, B.J. 2002. Crop sequence and nitrogen fertilization effects on soil properties in the western Corn Belt. Soil Science Society of America Agronomy Journal 66: 596-601.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10<sup>a</sup> Ed. Prentice Hall, Madrid, España, 1096 pp. En Kieling, D.D. 2004. Estudio de la remoción biológica del nitrógeno a partir de lodo nitrificante cultivado en medio autotrófico sobre condiciones anóxicas. Tesis Magister. Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 119 pp.
- Masiero, B., Galarza, C. y Conde, M.B. 2006. Análisis de un ensayo de larga duración con modelos mixtos. XIII Reunión científica del Grupo Argentino de Biometría, Tucumán, Argentina.
- Mc Neill, A. and Unkovich, M. 2007. The Nitrogen Cycle in Terrestrial Ecosystems. In: Marschner, P. and Rengel, Z. (eds.). Soil Biology, Volume 10. Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Berlin: Springer-Verlag, pp. 37-64. En: Miller Gallego, J. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoníaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Tesis de maestría. UNC Palmira, Colombia, 145 pp.
- Medeiros, J.A. 2006. Alternativas de manejo para el uso de urea en la producción de Maíz y Trigo. Tesis Magister. Universidad de Missouri, Colombia, 110 pp.
- Mendum, T.A., Sockett, R.E. and Hirsch, P.R. 1999. Use of molecular and isotopic techniques to monitor the response of autotrophic ammonia-oxidizing populations of the subdivision of the class Proteobacteria in arable soils to nitrogen fertilizer. Applied Environmental Microbiology 65: 4155-4162.
- Mendum, T.A. and Hirsch, P.R. 2002. Changes in the population structure of  $\beta$  -group autotrophic ammonia oxidizing bacteria in arable soils in response to agricultural practice. Soil Biology and Biochemistry 34: 1479-1485.
- Merry, R.H. and Spouncer, L.R. 1998. The measurement of carbon in soils using a microprocessor controlled resistance furnace. Communications in Soil Science and Plant Analyses 19: 707-720.
- Miller Gallego, J. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoníaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Tesis de maestría. UNC Palmira, Colombia, 145 pp.
- MinAgri, 2015. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. Siembra, Cosecha, Producción y Rendimiento. Publicado en internet, disponible en [http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/informacion\\_agropecuaria/04=Distribucion/08-Cosecha%20Fina%202014-15/cordoba/marcosjuarez.php](http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/informacion_agropecuaria/04=Distribucion/08-Cosecha%20Fina%202014-15/cordoba/marcosjuarez.php). Activo Julio 2016.

- Molina, V., Ulloa, O., Farías, L., Urrutia, H., Ramírez, S., Junier, P., and Witzel, K.P. 2007. Ammonia-Oxidizing  $\beta$ -Proteobacteria from the oxygen minimum zone off Northern Chile. *Applied Environmental Microbiology* 73 (11): 3547-3555.
- Murphy, B.W. 2015. Impact of soil organic matter on soil properties—a review with emphasis on Australian soils. *Soil Research* 53 (6): 605-635.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Mini Review Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer, G. 1999. Genetic fingerprinting of microbial communities present status and future perspectives. In: *Methods of Microbial Community Analysis. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*. Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Geen, P. (eds.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canadá, 4 pp.
- Navarro Blaya, S. y Navarro García, G. 2003. *Química Agrícola*. 2<sup>da</sup> Ed. Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Mundi-Prensa, Madrid, 487 pp.
- Navarro, C.A., Echeverría, H. y González, N. 1980. Cinética de las reacciones de amonificación y nitrificación en algunos suelos de la Argentina. *Actas IX Reunión Argentina de Ciencia del Suelo*. Paraná, Tomo II, pp. 431-437. En: Darwich, N.A. 2006. Nitrógeno: “Constructor de Proteínas”. En: *Manual de Fertilidad de Suelos y Uso de Fertilizantes*. Darwich, N.A. (ed.). 3<sup>ra</sup> Ed. Fertilizar Asociación Civil. Mar del Plata, Argentina, pp. 61-87.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C. and Prosser, JI. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10: 2966-2978.
- Nieder, R. Bendi, D.K. and Scherer, H.W. 2010. Fixation and defixation of ammonium in soils: A Review. *Biology and Fertility Soils* 47:1-14.
- Norton, J., Klotz, M.G., Stein, L.Y., Arp, D.J., Bottomley, P.J., Chain, P.J.P., Hauser, L.J., Land, M.L., Larimer, F.W., Shin, M.W., and Starkenburg, S.R. 2008. Complete Genome Sequence of *Nitrosospira multififormis*, an Ammonia-Oxidizing Bacterium from the Soil Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 3559-3572.
- Norton, J. 2011. Diversity and Environmental Distribution of Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Nitrification* 40-50.
- Odum E.P. 1969. The strategy of ecosystem development. *Science* 164: 262-270. En: Lynch, J.M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M. P., Smalla, K., Torsvik, V. and Nannipieri, P. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility Soils* 40: 363-385.
- Orozco, F. 1999. *La Biología del Nitrógeno, conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas*. Tomo I. Publicaciones Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 231 pp. En: Miller Gallego, J. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoníaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Tesis de maestría. UNC Palmira, Colombia, 145 pp.

- Ouyang, Y., Norton, J.M., Stark, J.M., Reeve, J.R. and Habteselassie, M.Y. 2016. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 96: 4-15.
- Panichelli, L. 2002. Agrosustentable: Fertilizantes. Publicado en internet, disponible en <http://www.ingenieroambiental.com>. Activo Enero 2011.
- Pearson, K. 1926. On the coefficient of racial likeness. *Biometrika* 18: 105-117.
- Phillips, C.J., Harris, D., Dollhopf, S.L., Gross, K.L., Prosser, J.I. and Paul, A.A. 2000. Effects of Agronomic Treatments on Structure and Function of Ammonia-Oxidizing Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12): 5410-5418.
- Pommerening-Röser, A. and Koops, H.P. 2005. Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria. *Microbiology Research* 160: 27-35.
- Prosser J.I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 30: 125-81. En: Kurola, J. 2006. Nitrification and autotrophic ammonia-oxidising bacteria in soil. En: *Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation*. Yliopistopaino, University of Helsinki, pp. 15-20.
- Quiroga, A., Funaro, D., Ormeño, O., Bono, A. y Scianca, C. 2003. Manejo del agua para los cultivos de girasol y maíz en suelos de las regiones semiárida y subhúmeda pampeana. *Cultivos de Cosecha Gruesa. Actualización 2003. Boletín de Divulgación Técnica N° 77. EEA INTA Anguil*. 264 pp. En: Barraco, M. y Díaz-Zorita, M. 2005. Momento de fertilización nitrogenada de cultivos de maíz en Hapludoles Típicos. *Ciencia de Suelo* 23 (2): 197-203.
- Roper, M.M. and Ophel-Keller, K.M. 1998. Soil microflora as bioindications of soil health. In: *Biological indicators of soil health*. Doube, B.M. and Gupta, V.V. (eds.). CABI, Wallingford, pp. 157-178. En: Abril, A., 2003. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral* 13: 195-204.
- Ros, G.H., Hanegraaf, M.C., Hoffland, E. and van Riemsdijk, W.H. 2011. Predicting soil N mineralization: Relevance of organic matter fractions and soil properties. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1714-1722.
- Ros, G.H. 2012. Predicting soil N mineralization using organic matter fractions and soil properties: A re-analysis of literature data. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 132-135.
- Ruiz Rueda, O. 2008. Nitrifying and Denitrifying Bacterial Communities in the Sediment and Rhizosphere of a Free Water Surface Constructed Wetland. Tesis Doctoral. Institut d' Ecología Aquàtica, Universitat de Girona, 120 pp.
- Sainz Rosas, H., Echeverría, H.E., Studdert, G.A. and Andrade, F.H. 1999. No-till corn nitrogen uptake and yield: effect of urease inhibitor and application time. *Agronomy Journal* 91: 950-950. En: Echeverría, H.E. y Sainz Rosas, H. 2006. Nitrógeno. En: *Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos*. Echeverría, H. E. y García, F.O. (eds.). Ediciones Inta, Buenos Aires, Argentina, pp. 69-97.
- Schmidt, E.L. and Belser, L.M. 1994. Autotrophic Nitrifying Bacteria. In: *Methods of Soil Analysis: Part 2-Microbiological and Biochemical Properties*, Science Society of America Agronomy Journal, USA, pp. 159-177.
- Schmidt, I. and Bock, E. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Archives of Microbiology* 167: 106-111.

- Shannon, C.E. and Weaver, W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zhang, J. and He, J. 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environmental Microbiology* 10 (6): 1601-1611.
- Shen, Q.R., Ran, W. and Cao, Z.H. 2003. Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere* 50: 747-753.
- Skiba, U.A. and Smith, K.A. 2000. The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. *Chemosphere-Global Change Science* 2: 379-386. En: Forte, A. 2006. Denitrifier and Nitrifier activities and N<sub>2</sub>O emissions of Fine and Coarse textured soils of a mediterranean Irrigated cropland in Southern Italy. *Tesi di Dottorato. Universita' Degli Studi Di Napoli Federico II Dipartimento Di Biologia Strutturale E Funzionale, Italy*, 175 pp.
- Soto, O.P., Jahn, E. y Arredondo, S. 2004. Mejoramiento del porcentaje de proteína en Maíz para ensilaje con el aumento y parcialización de la fertilización nitrogenada. *Agricultura Técnica* 64 (2): 156-162.
- Sow, S.L.S., Khoo, G., Chong, L.K., Smith, T.J., Harrison, P.L. and Ong, H.K.A. 2014. Molecular diversity of ammonia-oxidizing bacteria community in disused tin-mining ponds located within Kampar, Perak, Malaysia. *World Journal Microbiology Biotechnology* 30: 757-766.
- Stephen, J.R., Mc Caig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I. and Embley, T.M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rDNA sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 62: 4147-4154.
- Stephen, J.R., Kowalchuk, G.A., Bruns, M.A.V., Mc Caig, A.E., Phillips, C.J., Embley, T.M. and Prosser, J.I. 1998. Analysis of  $\beta$ -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2958-2965.
- Stevenson J.F. 1985. Nitrogen transformations in soil: A perspective. In: *Nitrogen and the Environment*. Nuclear and Institute for Agriculture, Faisaisbad, Pakistan. pp. 7-26. En: Canali, S. and Benedetti, A. 2006. Soil Nitrogen Mineralization. In: *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. Bloem, J., Hopkins and D.W., Benedetti, A. (eds.). CABI Publishing. USA, pp. 127-135.
- Stevenson, F.J. 1982. Origin and distribution of Nitrogen soils. In: *Nitrogen in agricultural soils*. Stevenson, F.J. (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 1-42.
- Stockdale, E.A. and Brookes, P.C. 2006. Detection and quantification of the soil microbial biomass impacts on the management of agricultural soils. *Journal of Agricultural Sciences* 144: 285-302. En: Hirsch, P.R., Mauchline, T.H. and Clark, I.M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 878-887.
- Studdert, G.A. and Echeverría, H.E. 2000. Crop rotations and nitrogen fertilization to manage soil organic carbon dynamics. *Soil Science Society of America Agronomy Journal* 64(4): 1496-1503.
- Studdert, G.A., Domínguez, G.F., Eiza, M.J., Videla, C. and Echeverría, H. 2008. Materia orgánica particulada y su relación con la fertilidad nitrogenada en el sudeste bonaerense. En: Galantini, J.A. (ed.) *Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina*. Bahía Blanca, Argentina, pp. 53-69.

- Suzuki, I., Dular, U. and Kwok, S.C. 1974. Ammonia and ammonium ion as substrate for oxidation by Nitrosomonas cells and extracts. *Journal Bacteriology* 120 (1): 556-558.
- Sylvia, D., Harter, P., Fuhrmann, J. and Zuberer, D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2<sup>da</sup> Ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall. 640 pp. En: Miller Gallego, J. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoníaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Tesis de maestría. UNC Palmira, Colombia, 145 pp.
- Tabatabai, M.A. 1996. Soil organic matter testing: An over-view. In: *Soil Organic Matter: Analysis and Interpretation*. Magdoff, F. (eds.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 1-10. En: Gasparoni, J.C. 2008. Determinación de la material orgánica del suelo. En: *Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina*. Galantini, J.A. (ed.). 1<sup>ra</sup>. Ed. Editorial UNS. Bahía Blanca, Bs. As., Argentina, pp. 41-50.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Taylor, A., Zeglin, L.H., Wanzek, T.A., Myrold, D.D. and Bottomley, P.J. 2012. Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations and contributions to soil nitrification potentials. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 6: 2024-2032.
- Tisdale, S.L. and Nelson, L.N. 1991. *Fertilidad de los suelos y Fertilizantes*. Uteha, México, 760 pp.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Linères, M., Chèneby, D. and Nicolardot, B. 2000. Biochemical quality of crop residues and C and N mineralization under non-limiting N conditions. *Soil Science Society American Journal* 64: 918-926. En: Nicolardot, B., Recous, S. and Mary, B. 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C: N ratio of the residues. *Plant and Soil* 228: 83-103.
- Ward, B.B., Voytek, M.A. and Witzel, R.P. 1997. Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification. *Microbial Ecology* 33: 87-96.
- Ward, B.B. 2008. Nitrification. In: *Ecological Processes*. Jørgensen, S.E. and Fath, B.D. (eds.) Oxford, USA, pp. 2511-2518.
- Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, J.K. and Hallin, S. 2010. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management. *Applied Soil Ecology* 45: 193-200.
- Wiens, J.J. and Graham, C.H. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review Ecology Systematics* 36: 519-539. En: Losos, J.B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters* 11: 995-1007.
- Wright, A., Hons, F.M. and Matocha, J.E. 2005. Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology* 29: 85-92.
- Wu, Y., Lu, L., Wang, B., Lin, J., Cai, Z., Yan, X. and Jia, Z. 2011. Long-term field fertilization significantly alters community structure of ammonia-oxidizing bacteria

- rather than archaea in a paddy soil. *Soil Science Society of America Journal* 75: 1405-1413.
- Wyngaard, N., Echeverría, H.E, Sainz Rozas, H.R and Divito, G.A. 2012. Fertilization and tillage effects on soil properties and maize yield in a Southern Pampas Argiudoll. *Soil and Tillage Research* 119: 22–30.
- Yu, W., Xu, Y., Bi, M., Ma, Q. and Zhou, H. 2010. Activity and Composition of Ammonia-Oxidizing Bacteria in an Aquic Brown Soil as Influenced by Land Use and Fertilization. *Pedosphere* 20 (6): 789-798.
- Yun-fu, G., Xiang, Y., Xiao-pig, Z., Shi-hua, T., Xi-fa, S. and Lindstrom, K. 2008. Effect of different fertilizer treatments on quantity of soil microbes and structure of ammonium oxidizing bacterial community in a calcareous purple paddy soil. *Agricultural Sciences in China* 7 (12): 1481-1489.
- Zhang, L.M., Hu, H.W., Shen, J.P. and He, J.Z. 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal* 6: 1032-1045.
- Zheng, Y., Zhang, L.M., Zheng, Y.M., Di, H. and He, J.Z. 2008. Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal Soils Sediments* 8: 406-414.