

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**DOS ASPECTOS DEL CICLO DEL NITRÓGENO:**

**Fijación biológica y  
emisión de óxido nitroso**

**por**

**María del Pilar IRISARRI**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Doctora en Ciencias Agrarias

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
Agosto 2014

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Matilde Soubes, el Dr. Ariel Szogi y la Dra. Lillían Frioni el 11 de agosto de 2014. Autora: Mag. María del Pilar Irisarri. Director Dr. Jorge Monza, Co-director Dr. José Palacios.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Comité Académico de Posgrado en Ciencias Agrarias de la Facultad de Agronomía por permitir mi ingreso al Programa de Doctorado mediante el Artículo 10 del Reglamento, “aportes de trabajos científicos publicados que acrediten una prolongada y sólida línea de trabajo con resultados originales”. En especial a César Basso y Jorge Urioste por su contribución a mejorar el formato de la tesis.

Esta tesis supone el resumen del trabajo de muchos años por lo que prefiero agradecer en general a todos quienes me acompañaron a lo largo de estos:

A los autores y co-autores de los artículos de esta tesis. También a quienes han sido reconocidos en cada uno de esos artículos. Entre ellos a las distintas instituciones y programas que financiaron la investigación y me permitieron nada menos que trabajar en lo que me gusta.

En forma particular a todos quienes trabajaron conmigo en los laboratorios de Bioquímica y de Microbiología de la Facultad y de Facultad de Química. Agradezco también a los que me acompañaron en el camino desde el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Treinta y Tres) y en los laboratorios donde estuve en Madrid, Granada y Ghent.

A Pepe por aceptar la co-tutoría y su paciencia con la corrección.

Al Tribunal por leer este trabajo tan largo y diverso.

Y muy especialmente a Jorge por haberme alentado a intentar este desafío cuando ya no parecía una opción muy razonable.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b>1.1. NITRÓGENO</b> .....	1
<b>1.2. OBJETIVO Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS</b> .....	2
<b>2. <u>MARCO TEÓRICO</u></b>	
<b><u>EL CICLO DEL NITRÓGENO</u></b> .....	3
<b>2.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO</b> .....	7
<b>2.1.1. <u>Fijación simbiótica</u></b> .....	10
2.1.1.1. Leguminosas.....	10
2.1.1.2. Rizobios.....	10
2.1.1.3. Genes simbióticos de los rizobios.....	11
<b>2.1.2. <u>Fijación en vida libre por cianobacterias</u></b> .....	13
2.1.2.1. Heterocisto.....	13
<b>2.1.3. <u>Métodos de estimación de la actividad nitrogenasa</u></b> .....	15
<b>2.2. DESNITRIFICACIÓN</b> .....	16
<b>2.2.1. <u>Procesos por los que se produce N<sub>2</sub>O en los suelos</u></b> .....	17
<b>2.2.2. <u>Consumo de N<sub>2</sub>O</u></b> .....	19
<b>3. <u>FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LOTUS</u></b> .....	21
<b>3.1. LEGUMINOSAS FORRAJERAS</b> .....	23
3.1.1. <b><u>Leguminosas forrajeras del género Lotus</u></b> .....	23
3.1.2. <b><u>Inoculación de leguminosas forrajeras en Uruguay</u></b> .....	25
<b>3.2. MICROSIMBIONTES DEL GÉNERO LOTUS</b> .....	26
<b>3.3. DESNITRIFICACIÓN EN RIZOBIOS</b> .....	27

3.4. DIVERSIDAD DE RIZOBIOS .....	30
3.4.1. <u>Análisis de la diversidad de rizobios aislados de lotus en suelos de Uruguay</u> .....	30
3.4.2. <u>Factores que afectan la diversidad de rizobios</u> .....	34
<b>4. <u>FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR CIANOBACTERIAS Y FERTILIZACIÓN EN ARROZ</u></b> .....	37
4.1. EL ARROZ EN URUGUAY_.....	40
4.2. DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN UN SUELO INUNDADO .....	41
4.3. FBN EN ARROZALES .....	41
4.3.1. <u>Cianobacterias</u> .....	42
4.3.1.1. Diversidad y abundancia de cianobacterias con heterocisto en el arrozal .....	43
4.3.1.2. Actividad fijadora de N <sub>2</sub> fotodependiente en el arrozal ....	45
4.3.2. <u>Recuperación del N del fertilizante</u> .....	48
4.4. INOCULACIÓN DE ARROZ CON CIANOBACTERIAS .....	49
4.4.1. Inoculación con cianobacterias nativas en Uruguay .....	49
4.5. FOTOSÍNTESIS EN CIANOBACTERIAS .....	51
4.5.1. <u>Cianobacterias y radiación UV</u> .....	52
4.5.1.1. Efectos sobre la fotosíntesis .....	53
4.5.1.2. Producción de EROs .....	54
4.5.1.3. Reparación y defensa frente al daño .....	55
4.5.2. <u>Efecto de otros estreses abióticos en cianobacterias</u> .....	56
4.5.2.1. Estrés osmótico .....	57
<b>5. <u>EMISIONES DE N<sub>2</sub>O EN AGROSISTEMAS DE URUGUAY</u></b> .....	59
5.1. GASES DE EFECTO INVERNADERO Y AGRICULTURA_ .....	62
5.1.1. <u>Metano</u> .....	64
5.1.1.1. Fuentes de metano_.....	64
5.1.1.2. Sumideros de metano .....	65
5.1.2. <u>Óxido nitroso</u> .....	65

5.1.2.1. Fuentes de N <sub>2</sub> O .....	66
5.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS GEI .....	67
5.2.1. <u>Manejo del suelo y emisiones de N<sub>2</sub>O</u> .....	67
5.2.2. <u>Emisiones de GEI en el cultivo de arroz</u> .....	71
5.2.3. <u>Inhibidores de la nitrificación</u> .....	75
<b>6. <u>DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u></b> .....	<b>78</b>
6.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LOTUS ...	78
6.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA POR CIANOBACTERIAS EN ARROZ ,,,	81
6.3. EMISIÓN DE N <sub>2</sub> O .....	83
6.3.1. <u>Rotaciones y laboreo</u> .....	83
6.3.2. <u>Cultivo de arroz</u> .....	84
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>87</b>
<b>8. <u>ANEXO (PUBLICACIONES)</u></b> .....	<b>118</b>
8.1. CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA NODULATING <i>Lotus</i> <i>subbiflorus</i> FROM URUGUAYAN SOILS.....	119
8.2. DENITRIFICATION ABILITY OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM <i>Lotus</i> sp. ....	128
8.3. DIVERSITY OF RHIZOBIA NODULATING <i>Lotus corniculatus</i> GROWN IN NORTHERN AND SOUTHERN REGIONS OF URUGUAY .....	134
8.4. DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS CON HETEROCISTOS EN SUELOS CULTIVADOS CON ARROZ .....	145
8.5. CYANOBACTERIA IN URUGUAYAN RICE FIELDS: DIVERSITY, NITROGEN FIXING ABILITY AND TOLERANCE TO HERBICIDES AND COMBINED NITROGEN .....	152
8.6. ROLE OF CYANOBACTERIA AS BIOFERTILIZERS: POTENTIALS AND LIMITATIONS .....	161

<b>8.7. CYANOBACTERIAL INOCULATION AND NITROGEN FERTILIZATION IN RICE .....</b>	<b>177</b>
<b>8.8. DIFFERENTIAL RESPONSE TO MODERATE UV-B IRRADIATION OF TWO HETEROCYSTOUS CYANOBACTERIA ISOLATED FROM A TEMPERATE RICEFIELD .....</b>	<b>183</b>
<b>8.9. NITRIFICATION AND DENITRIFICATION ASSOCIATED WITH N<sub>2</sub>O PRODUCTION IN A TEMPERATE N-FERTILIZED IRRIGATED URUGUAYAN RICEFIELD .....</b>	<b>194</b>
<b>8.10. EMISIONES DE ÓXIDO NITROSO POR SUELOS CULTIVADOS CON ARROZ: EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA NITRIFICACIÓN .....</b>	<b>199</b>
<b>8.11. NITROUS OXIDE EMISSIONS FROM AN URUGUAYAN ARGIUDOLL UNDER DIFFERENT TILLAGE AND ROTATION TREATMEN.....</b>	<b>207</b>
<b>8.12. EMISIONES DE CH<sub>4</sub> Y N<sub>2</sub>O EN UN ARROZAL: PRIMERAS MEDIDAS EN EL SISTEMA PRODUCTIVO URUGUAYO.....</b>	<b>217</b>
<b>8.13. YIELD-SCALED GLOBAL WARMING POTENTIAL OF TWO IRRIGATION MANagements IN A HIGHLY PRODUCTIVE RICE SYSTEM IN URUGUAY .....</b>	<b>227</b>

## RESUMEN

En esta tesis se exploran dos aspectos del ciclo del N en suelos agrícolas en Uruguay: la entrada de N al ecosistema vía fijación biológica y la pérdida como N<sub>2</sub>O. El Capítulo 3 trata sobre la fijación biológica en la simbiosis rizobio-*Lotus*. Se buscó establecer el tipo de rizobios que nodula *L. subbiflorus* y *L. corniculatus*, cuál es su diversidad y si esta se modifica frente a un estrés ambiental. Se evidenció gran diversidad entre los rizobios del género *Mesorhizobium* que nodulan *Lotus corniculatus*. La cepa usada como inoculante comercial no se recuperó de nódulos de plantas instaladas en praderas con historia de inoculación, pero los genes simbióticos de los aislamientos de los nódulos y el inoculante comercial son similares. Estos rizobios no presentan características de desnitrificantes, mientras que los *Bradyrhizobium* que nodulan *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* sí. El Capítulo 4 trata sobre cianobacterias con heterocistos en arrozales. Las preguntas a responder fueron cuáles son los géneros de estas cianobacterias en un suelo de arrozal en rotación con pasturas, y cómo varían a lo largo del ciclo del cultivo. También se evaluó cuánto N<sub>2</sub> fijan, si es suficiente el tiempo del cultivo para que su N se mineralice y si la inoculación con cianobacterias aporta N al arroz. Finalmente, se intentó comprender cómo afecta a la fijación el agregado de fertilizante, herbicidas y la luz UV-B. Se concluyó que en vida libre las cianobacterias no son una fuente significativa de nitrógeno para el arroz, si bien su mineralización ocurre durante el ciclo del cultivo. El Capítulo 5 aporta los primeros datos de mediciones de emisiones de gases de efecto invernadero por agrosistemas en Uruguay. Se buscó responder si es diferente la cantidad de N<sub>2</sub>O emitido por cultivos agrícolas, praderas y campo natural, y si es afectada por las rotaciones y el laboreo del suelo. En el caso de arroz, se intentó establecer cuál es en nuestras condiciones el potencial de calentamiento global y si puede reducirse con el manejo del riego. No se evidenciaron diferencias consistentes en el N<sub>2</sub>O emitido por agricultura continua o rotaciones, ni entre laboreo convencional y siembra directa. En el cultivo de arroz, las emisiones de CH<sub>4</sub> son mayores que las de N<sub>2</sub>O y el control del agua de riego permitió mitigar las emisiones totales, pero puede disminuir el rendimiento del arroz.

**Palabras clave:** rizobios, *Lotus*, cianobacterias, arroz, desnitrificación

## **TWO ASPECTS OF THE NITROGEN CYCLE: BIOLOGICAL FIXATION AND NITROUS OXIDE EMISSION**

### **SUMMARY**

This thesis explores two aspects of the N cycle in agricultural soils of Uruguay, N inputs via biological fixation and its losses as N<sub>2</sub>O. In Chapter 3, where biological nitrogen fixation by rhizobia in symbiosis with *Lotus* was studied, the aim was to determine the type of rhizobia that nodulate *L. subbiflorus* and *L. corniculatus*, their capacity to denitrify and if their diversity was influenced by the environmental conditions. Rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* of the genus *Mesorhizobium* were highly diverse. The commercial inoculant for *L. corniculatus* could not be isolated from nodules of plants from pastures with previous history of inoculation, but isolates from nodules and the commercial inoculant shared similar symbiotic genes. These rhizobia did not show characteristic of denitrifiers while bradyrhizobia nodulating *L. uliginosus* and *L. subbiflorus* did. Chapter 4 focuses on heterocystous cyanobacteria isolated from Uruguayan ricefields. The goal was to know the most abundant genus of cyanobacteria present in a ricefield in rotation with pastures and how they fluctuate along the rice cycle. How much N<sub>2</sub> was fixed, if the N in cyanobacteria was mineralized during the rice cycle and if cyanobacterial inoculation contribute with N uptake by rice, were analstudied. The effects on nitrogen fixation of fertilizer addition, herbicides and UV-B radiation were also evaluated. It was concluded that free living cyanobacteria were not a significant nitrogen source for rice. Instead, mineralization of cyanobacteria occurred quickly during the culture cycle. Chapter 5 contributed with the first data of greenhouse gases emissions in Uruguayan agrosystems. The hypothesis was that crops and pastures emit different amounts of N and are affected by rotations and tillage. The global warming potential for rice in our conditions was estimated and potential mitigation by irrigation control was evaluated. Consistent differences in N<sub>2</sub>O emission among treatments of continuous agriculture versus rotations or conventional tillage vs no-till could not be proved. In rice systems CH<sub>4</sub> emissions are higher than N<sub>2</sub>O. A mitigation strategy reducing irrigation decreased emissions but may also diminish rice yield.

**Keywords:** *Lotus*, rhizobia, cyanobacteria, rice, denitrification

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. NITRÓGENO

El nitrógeno es un nutriente esencial para la vida, y constituye el cuarto elemento en abundancia en las biomoléculas; por ello su ciclo es uno de los temas más estudiados de la microbiología del suelo desde hace más de 100 años. A pesar de ello, algunos pasos de este ciclo no se entienden o no se han cuantificado cabalmente.

En la naturaleza coexisten compuestos nitrogenados en los que el rango de oxidación del N varía entre -3 como en el amonio, hasta +5 en el nitrato, la forma más oxidada. La conversión entre las distintas formas de N es mediada mayoritariamente por enzimas presentes en microorganismos del suelo.

El N con frecuencia es el nutriente del suelo más limitante para las plantas debido, por un lado, a su elevada extracción por los cultivos, y por otro a sus pérdidas por desnitrificación, erosión, lavado y volatilización química, entre otros procesos. Además, de entre los ciclos biogeoquímicos de los elementos, es el del N sobre el que las actividades antropogénicas tienen un impacto mayor (Arp y Stein, 2003). La producción de alimento y energía a partir de la agricultura, junto a la industria y las fuentes de energía, han más que duplicado la cantidad de nitrógeno reactivo circulando anualmente sobre el suelo (Davidson *et al.*, 2012).

Una preocupación relevante en la agricultura moderna es la cantidad creciente de fertilizante nitrogenado empleado, dado que puede modificar el ciclo del nitrógeno, en la medida que buena parte de éste se pierde (Schlesinger, 2009). Estas pérdidas, con resultados negativos para el ambiente, pueden incluir la emisión aumentada a la atmósfera de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), gas con efecto invernadero o la pérdida de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del suelo eutrofizando corrientes de agua. Por lo tanto, profundizar en el conocimiento de microorganismos involucrados en el ciclo de N contribuye a mejorar la eficiencia de su uso como fertilizante y reducir sus potenciales efectos ambientales negativos.



Las preguntas que se plantearon en cada uno de los temas de que trata esta tesis intentan contribuir a maximizar el aporte del N<sub>2</sub> fijado por los microorganismos a las plantas y a mitigar las pérdidas de nitrógeno del suelo como N<sub>2</sub>O.

Las interrogantes planteadas apuntan a caracterizar genéticamente los rizobios nativos/naturalizados que nodulan distintas especies de Lotus, leguminosa forrajera importante en el país. Por otro lado, era necesario conocer la participación de esta población de rizobios en el ciclo del N (fijación/desnitrificación) y determinar su eficiencia frente a la cepa recomendada por muchos años en el país y que se emplea en la fabricación de inoculantes comerciales.

El otro sistema fijador de N<sub>2</sub> estudiado fue el de cianobacterias heterocísticas en el cultivo de arroz. Con anterioridad a los trabajos aquí comunicados, no se conocía la composición de la microflora heterocística, la influencia que los factores del ambiente ejercen en su desarrollo y distribución y el comportamiento de algunas especies en la inoculación del cultivo de arroz en las condiciones de Uruguay.

La estimación de las pérdidas como N<sub>2</sub>O es una primera contribución al conocimiento de la dinámica de las pérdidas de N del suelo y del fertilizante mediante emisiones gaseosas, en sistemas agrícolas tradicionales que incluyen rotaciones y en el cultivo de arroz. El esclarecimiento de algunos factores que afectan a dichas emisiones contribuirá a diseñar prácticas de manejo tendientes a minimizar estas pérdidas que representan perjuicio al ecosistema y pérdida económica.

## **1.2. OBJETIVO Y ORGANIZACIÓN DE LA TESIS**

El objetivo general de esta tesis fue avanzar en el conocimiento del ciclo del nitrógeno en sistemas agrícolas de Uruguay.

Para esto se da un marco general a los temas tratados en el Capítulo 2 y se agrupan por un lado los diferentes resultados obtenidos y publicados respecto a la entrada de N al ecosistema a través de la fijación biológica, por rizobios y cianobacterias (Capítulos 3 y 4 respectivamente) y por otro, a la pérdida de N del suelo como N<sub>2</sub>O (Capítulo 5). Los objetivos específicos de cada tema se presentan en el capítulo correspondiente.

## **2. MARCO TEÓRICO**

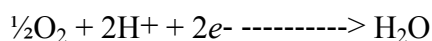
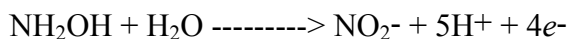
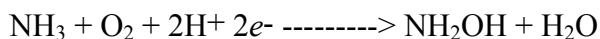
### **EL CICLO DEL NITRÓGENO**

Si bien el N<sub>2</sub> gaseoso constituye en volumen el 79% de la atmósfera, esta forma no está disponible metabólicamente para las plantas, y sólo se convierte en una forma disponible tras su conversión, mayoritariamente en amonio, mediante el proceso de fijación. Esta fijación de nitrógeno puede ser biológica (FBN) o industrial (proceso Haber-Bosch). En suelos agrícolas se produce un fuerte aporte de nitrógeno a través de los fertilizantes, en los que el nitrógeno va en forma de amonio (o urea) y/o nitrato.

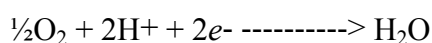
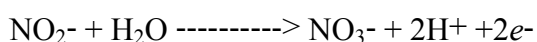
La FBN la realizan un tipo exclusivo de procariontes, los diazotrofos. El amoníaco (NH<sub>3</sub>) producto de la FBN es utilizado por los diazotrofos en vida libre, o exportado a las plantas en el caso de las bacterias fijadoras simbióticas. El nitrógeno fijado es asimilado por los vegetales en compuestos orgánicos que los animales usan como fuente de nitrógeno. La descomposición de la materia orgánica por microorganismos saprofitos se conoce como mineralización o amonificación, y el NH<sub>3</sub> producido es convertido a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por un proceso oxidativo conocido como nitrificación.

El proceso de nitrificación ocurre en dos pasos que tienen lugar en distintos microorganismos nitrificantes. En un primer paso el amonio es oxidado a nitrito vía hidroxilamina (a) y en un segundo paso el nitrito es oxidado a nitrato (b).

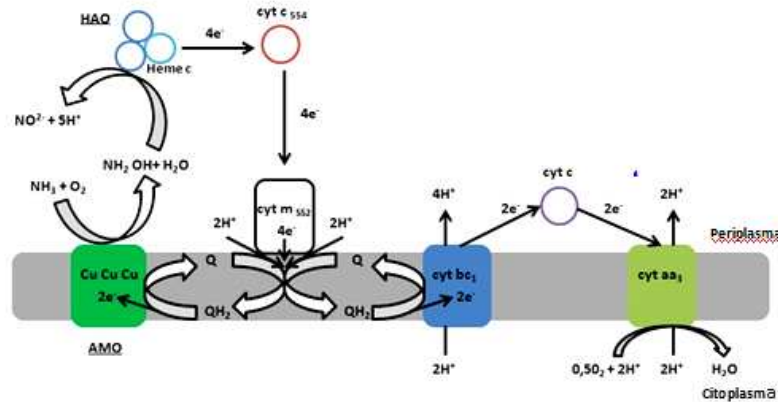
(a) Oxidación del NH<sub>3</sub> (Fig. 2.1):



(b) Oxidación del NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:



(a)



(b)

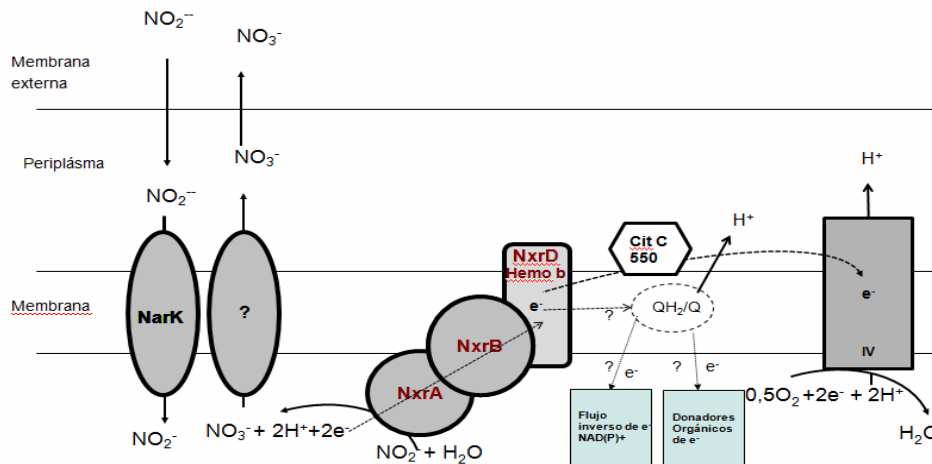
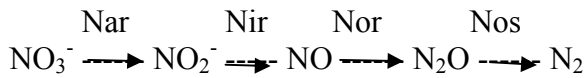


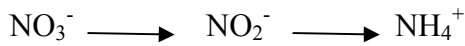
Figura 2.1 (a) Vías de oxidación de amonio y localización de sus enzimas en *Nitrosomonas europaea*. AMO: Amonio mono-oxigenasa, HAO: hidroxilamina oxidoreductasa, cyt: citocromo. (b) Organización putativa de la enzima oxidante del nitrito (NXR) y el transporte electrónico asociado a la misma en *Nitrobacter* sp. Los detalles marcados como (?) no se conocen (modificado de Starkenburg *et al.*, 2011).

La conversión del amonio, relativamente inmóvil por su capacidad de unirse al complejo de intercambio del suelo, en nitrato, muy móvil, provee al suelo de una forma de N con más oportunidades de perderse, razón por la que la nitrificación se considera central para el flujo de nitrógeno en el suelo (Philipot y Germon, 2005). Por otra parte hay que considerar la desnitrificación, mediante la cual el nitrato soluble es reducido al ser utilizado como aceptor de electrones en condiciones limitantes de oxígeno. Este proceso respiratorio involucra 4 reacciones catalizadas por 4 enzimas y rinde formas gaseosas con excepción de la primera reacción:

Nar: NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reductasa desasimilatoria Nir: NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reductasa Nor: NO reductasa Nos: N <sub>2</sub> O reductasa
--



El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> también puede reducirse a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por el proceso denominado reducción desasimilatoria de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (DNRA):



La reducción respiratoria a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en condiciones anaerobias está acoplada a la generación de un gradiente protónico a través de la membrana (Simon, 2002). La DNRA usa un aceptor de electrones para regenerar el NAD<sup>+</sup> y destoxificar el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> que se acumula en las células reductoras de nitrato (Moreno-Vivian y Ferguson, 1998) y genera poco ATP.



Solo la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> está acoplada a la producción de energía en la mayoría de los microorganismos. La reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> puede considerarse como un cortocircuito que evade la desnitrificación y la FBN (Cole y Brown, 1980), según se esquematiza en la figura 2.2.

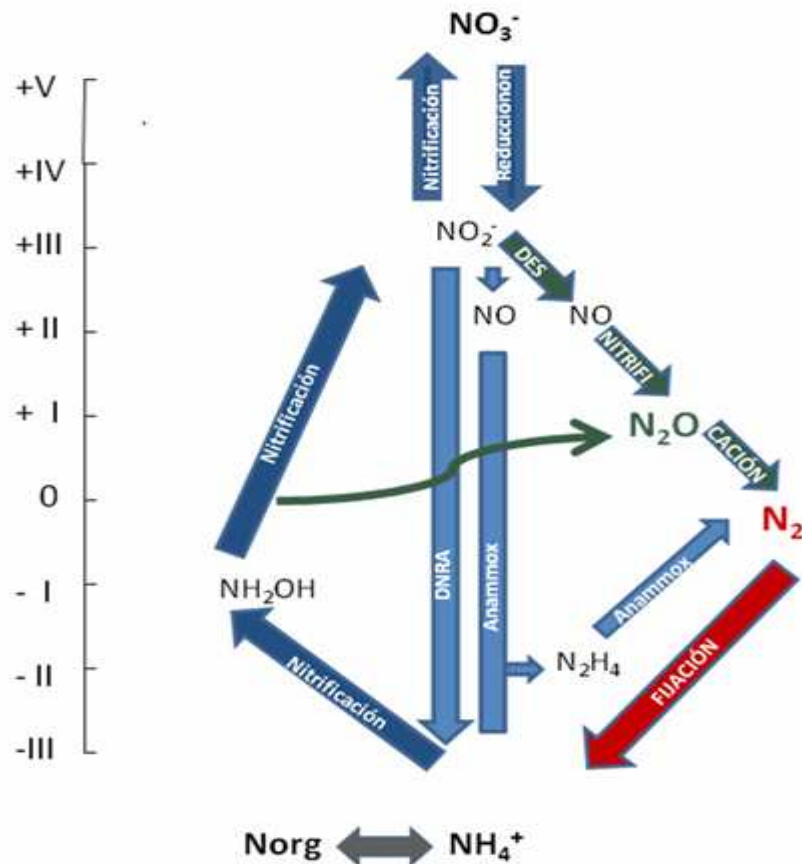


Figura 2.2. Principales vías biológicas de transformación del nitrógeno. El eje vertical corresponde a los estados de oxidación del N. Se destacan la fijación de  $N_2$  y los mecanismos productores de  $N_2O$  que son los temas de esta tesis (Canfield *et al.*, 2010, con modificaciones).

Anammox: oxidación anaerobia de amonio

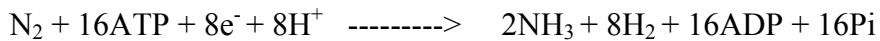
La oxidación anaeróbica de amonio (anammox) consiste en el consumo de amonio y nitrito (en relación 1:1) con liberación de gas  $N_2$ , y los organismos involucrados en este proceso son *Planctomycetales* (Strous *et al.*, 1999). Hasta el 67% de la producción de  $N_2$  en sedimentos marinos puede atribuirse al proceso anammox (Dalsgaard *et al.*, 2005). Datos más recientes han permitido demostrar una distribución más amplia de este proceso de remoción de N inorgánico que incluye zonas terrestres limitadas en oxígeno tales como humedales (Zhu *et al.*, 2010), reservorios de petróleo (Li *et al.*, 2010) y ecosistemas de agua dulce (Rich *et al.*, 2008). Estudios recientes (mediante marcaje isotópico) revelan que esta vía puede ser importante en suelos de arrozal y responsable de una pérdida significativa de N del suelo, ya que el suelo de arrozal saturado durante toda la estación de crecimiento

provee un hábitat ideal para las bacterias anammox, junto con la fertilización nitrogenada y los procesos acoplados de nitrificación-desnitrificación.

## 2.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

La FBN supone la mayor fuente del N fijado en la biosfera (Canfield et al., 2010), y es llevada a cabo por procariotas llamados colectivamente diazotrofos. Casi todos los diazotrofos emplean básicamente la misma enzima, la nitrogenasa, que funciona a la temperatura ambiente y presión atmosférica.

La reacción catalizada por la nitrogenasa es la siguiente:



La FBN puede considerarse eficiente, aunque parte de la energía consumida en el proceso se gasta en reducir protones ( $\text{H}^+$ ) a hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) de manera concomitante con la reducción de  $\text{N}_2$  a amonio. Esto hace que la fijación sea al menos un 25% menos eficiente. Hay cepas de bacterias fijadoras provistas de un sistema hidrogenasa que las hace capaces de reciclar parcial o totalmente el  $\text{H}_2$  producido por la nitrogenasa (Ruiz-Argüeso *et al.*, 2000) y recuperar parte de esa energía.

Los diazotrofos se encuentran tanto entre las Eubacteria como entre las Archaea. Un elemento unificador entre este tipo de microorganismos es el mecanismo de acción de la nitrogenasa y sus componentes estructurales. Los componentes catalíticos de la nitrogenasa incluyen dos metaloproteínas distintas, la dinitrogenasa (codificada por los genes *nifD* y *K*) y la dinitrogenasa reductasa (codificada por *nifH*). La única excepción a esta composición es la nitrogenasa dependiente de superóxido de *Streptomyces thermoautotrophicus*, cuya secuencia proteica no se conoce (Ribbe *et al.*, 1997).

La dinitrogenasa NifDK es una proteína heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ) que contiene un cofactor hierro-molibdeno (FeMoco) en cada subunidad  $\alpha$  (NifD) que tiene el sitio de reducción del sustrato, y un cluster FeS especial, denominado P-cluster, en la interfaz

entre ambas subunidades. El donador de electrones es una proteína con Fe, la dinitrogenasa reductasa NifH. NifH es un homodímero que contiene sitios de unión a ATP y un grupo Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> localizado en la interfaz entre ambos monómeros (Rubio y Ludden, 2008). Los genes que codifican estas proteínas, los genes accesorios para las proteínas implicadas en el transporte electrónico, la síntesis de los cluster metálicos y la regulación, conforman el regulón *nif* (Halbleib y Ludden, 2000).

Además de los componentes catalíticos, otros productos génicos son necesarios para que la nitrogenasa sea funcional. Entre estos, las enzimas biosintéticas del cofactor FeMo (FeMoco), NifENB, juegan un papel fundamental.

Existen formas alternativas de la nitrogenasa con cofactores del sitio activo que carecen de Mo y contienen vanadio o hierro. Estas nitrogenasas alternativas están presentes en escaso número de organismos, y no se han identificado en taxones que no codifiquen también la nitrogenasa con Mo (Boyd *et al.*, 2011).

La fijación de N<sub>2</sub> está regulada a nivel transcripcional en respuesta a los niveles ambientales de oxígeno y amonio. Como los componentes de la nitrogenasa son lábiles frente al oxígeno, los organismos diazotrofos han desarrollado una serie de estrategias para mantener la nitrogenasa en ausencia de oxígeno. En general, es ventajoso para la bacteria reprimir la transcripción cuando los niveles intracelulares de oxígeno son altos. También se reprime la expresión del sistema nitrogenasa, que es metabólicamente muy costoso, cuando los niveles celulares de N fijado son suficientemente altos. El grado en que estos factores afectan la transcripción, es característico de cada diazótrofo particular. La expresión de la nitrogenasa en los diazotrofos simbióticos es casi insensible al amonio, porque la exportación de amonio al simbionte impide que alcance niveles altos. El paradigma de regulación transcripcional es derivado de estudios en *K. pneumoniae*, primer diazótrofo estudiado bioquímicamente y genéticamente (Arnold *et al.*, 1988). En este modelo (figura 2.3), la expresión está regulada por NifA, un activador transcripcional que requiere un factor sigma específico ( $\sigma$ 54, producto de *rpoN*). La transcripción de *nifA* está bajo control de los productos de los genes *ntrBC*, que constituyen un sistema de dos componentes responsable de la regulación del nitrógeno celular. Además *nifA* es co-transcripto con *nifL*, que codifica una proteína regulatoria que responde al estatus

redox y nitrogenado. NifL actúa como regulador negativo en respuesta al oxígeno y al nitrógeno fijado. Por otra parte, bajo condiciones de limitación de energía o suficiencia de nitrógeno, el complejo nitrogenasa es rápida y reversiblemente inactivado por ribosilación-ADP de la proteína Fe (Martínez-Argudo *et al.*, 2004). Algunos diazotrofos poseen además regulación post-transcripcional, por lo que si bien parece haber muy poca variación en las secuencias y estructuras de las nitrogenasas, habrían tantos mecanismos de regulación de las mismas como especies fijadoras de N<sub>2</sub>.

Dos Santos *et al.* (2012) predijeron una mayor diversidad genética de diazotrofos de la que se suponía, al estudiar los genes *nifHDK* y *nifENB*. Estos investigadores proponen que la diazotrofia incluiría miembros de los filos Aquificae, Chrysogetetes, Deferribacterias, Fusobacteria, Nitrospirae, Spirochaetes y Verrucomicrobia.

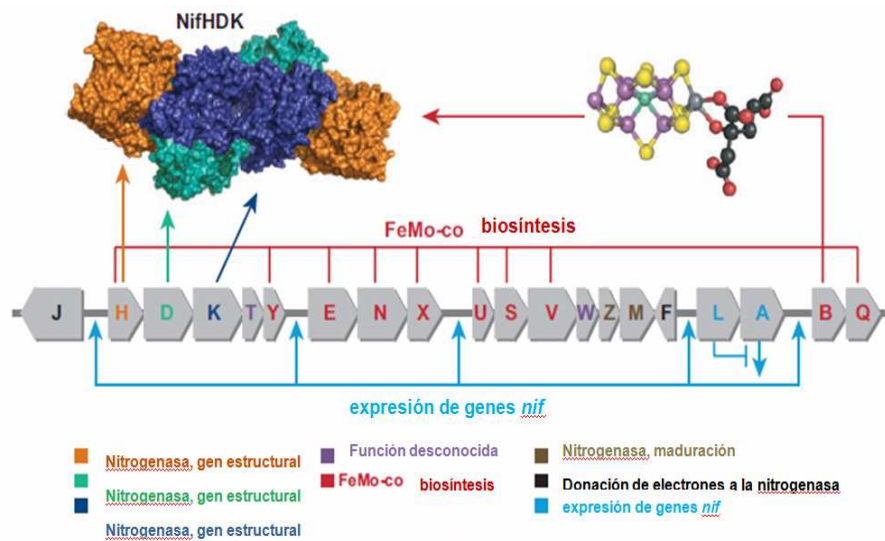


Figura 2.3. Genes de la fijación de nitrógeno (*nif*) en *Klebsiella pneumoniae*. Los genes cuyos productos están involucrados en la FBN están coloreados de acuerdo a sus funciones (modificado de Rubio y Ludden, 2008).

Desde un punto de vista de asociación con otras especies, generalmente los microorganismos fijadores de N<sub>2</sub> se agrupan en fijadores en vida libre, entre los que se encuentran los que fijan asociados más o menos laxamente a raíces, y fijadores simbióticos. Los diazotrofos en vida libre fijan nitrógeno para beneficio propio,



pudiendo hacerlo, según los casos, en condiciones aeróbicas, microaeróbicas, como anaeróbicas (Newton, 2007), mientras que los que fijan N<sub>2</sub> en simbiosis casi siempre lo hacen en condiciones microaeróbicas dentro de estructuras especializadas en las raíces de las plantas y suministran el N fijado a su huésped.

### **2.1.1. Fijación simbiótica**

Varios tipos de relaciones simbióticas se establecen entre plantas y bacterias diazotrofas, pero las más estudiadas son las de los rizobios con las raíces de las leguminosas. Las leguminosas (*Fabaceae*) constituyen la más importante de las familias de plantas capaces de fijar N<sub>2</sub> en simbiosis, tanto cuantitativamente como desde el punto de vista agrícola, económico y ecológico (Olivares *et al.* 2011). Otras especies vegetales que comprenden árboles y arbustos de diferentes familias de interés ambiental o forestal como *Alnus*, *Casuarina*, *Myrica*, etc. son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con el actinomiceto *Frankia* y constituyen las denominadas simbiosis actinorrícicas. También las cianobacterias pueden establecer relaciones simbióticas con plantas superiores, entre otras con un grupo de gimnospermas, las cicadáceas, y con la angiosperma *Gunnera* (Pawlowsky y Bergman, 2007). La mayoría de las cianobacterias, sin embargo, son capaces de crecer en vida libre y de fijar N<sub>2</sub>, y en simbiosis proporcionan nitrógeno a ambos integrantes del par simbiótico.

#### **2.1.1.1. Leguminosas**

La familia Fabaceae (Leguminosae) consiste en más de 19000 especies divididas en tres subfamilias, Papilionoideae, Mimosoideae y Caesalpinioideae (Lewis, 2005). La mayoría (96%) de las especies de Papilionoideae y Mimosoideae forman nódulos, mientras que solo pocos géneros (22%) de las Caesalpinioideae examinadas hasta ahora están noduladas (Sprent, 2009).

#### **2.1.1.2. Rizobios**

Los rizobios son bacterias Gram-negativas del suelo, que inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de plantas de la familia *Fabaceae* y en

los tallos de algunas leguminosas acuáticas (Delgado *et al.*, 2007). Excepcionalmente, se ha demostrado la capacidad de nodulación efectiva en una planta no leguminosa del género *Parasponia*.

Actualmente el grupo de los rizobios incluye los géneros *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella* y *Sinorhizobium* (ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium*, 2013), pertenecientes al orden *Rhizobiales* de las  $\alpha$ -proteobacterias. Recientemente se ha descubierto que algunas leguminosas del género *Mimosa* son noduladas por  $\beta$ -proteobacterias como *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Gyaneshwar *et al.*, 2011). Algunas especies de *Burkholderia* son promiscuas y nodulan efectivamente *Phaseolus vulgaris*.

Si bien los rizobios en general no fijan nitrógeno en condiciones de vida libre, *Azorhizobium caulinodans* puede fijar nitrógeno *ex planta* (Dreyfus *et al.*, 1988) y realiza ese proceso a concentraciones de oxígeno relativamente altas. También se conocen rizobios con estrategias bioenergéticas diferentes a la respiración y que contribuyen a la simbiosis, como metilotrofia en *Methylobacterium nodulans* y fotosíntesis en un grupo de *Bradyrhizobium* que nodulan leguminosas del género *Aeschynomene* (Jourand *et al.*, 2005, Giraud y Fleischman, 2004).

### **2.1.1.3. Genes simbióticos de los rizobios**

Pocas cepas de rizobios se han secuenciado completamente y representan menos del 1% de los genomas bacterianos completos disponibles a la fecha. El estudio genómico y proteómico de 14 cepas de rizobios diferentes pertenecientes a distintos géneros, demostró que existen múltiples estrategias de fijación en simbiosis y que no existiría un único tipo de genes esenciales para la simbiosis y la FBN (Black *et al.* 2012).

Los genes de la fijación de nitrógeno en rizobios se han dividido clásicamente en tres grupos: *nod*, *nif* y *fix*. Los genes *nod* están involucrados en la síntesis de los denominados factores Nod, que químicamente son lipoquitín-oligosacáridos, cuya estructura central es sintetizada por los productos de los genes *nodABC*,

considerados comunes a todos los rizobios (Perret *et al.*, 2000). Otras genes *nod* son específicos y sus productos catalizan la incorporación de distintos radicales en los factores Nod, que “adornan” la molécula y la hacen que sea reconocida específicamente por una leguminosa u otra.

La formación de los nódulos se inicia por la unión a los receptores de tipo quinasa de la leguminosa de factores Nod específicos para el huésped. Los factores Nod son esenciales para que los Rhizobiales desencadenen la curvatura del pelo radical, induzcan la formación del primordio nodular y entren a la raíz a través del hilo de infección mediante un complejo proceso (den Herder y Parniske, 2009). Los factores Nod se producen en respuesta a la presencia de flavonoides producidos como señal por la planta (Broughton *et al.*, 2000). Dicha regulación se realiza través de la acción de la proteína NodD, que se une a los flavonoides y regula la expresión del operón *nodABC* y del resto de operones Nod que determinan el rango de hospedero (Perret *et al.*, 2000). Los bradirizobios que nodulan el tallo de la leguminosa tropical *Aeschynomene* carecen de los genes *nodABC* comunes (Bonaldi *et al.*, 2010).

Los genes *nif* y *fix* están involucrados en el proceso de fijación, los *nif* son homólogos a los de *Klebsiella pneumoniae* y los *fix* no. La fijación de nitrógeno vía nitrogenasa requiere un ambiente anaeróbico o microaeróbico para el bacteroide y la familia de genes *fix* está involucrada en la regulación y metabolismo del oxígeno en esta circunstancia.

Los genes simbióticos se encuentran en plásmidos (denominados plásmidos simbióticos o pSym) en los rizobios de crecimiento rápido, mientras que en los de crecimiento lento o intermedio están integrados en el cromosoma en islas simbióticas (Sullivan *et al.*, 2002; Crossman *et al.*, 2008). Esta ubicación de los principales genes simbióticos nos indica su naturaleza accesoria y la capacidad de ser transferidos en forma horizontal. La organización de los genes simbióticos en plásmidos o islas móviles permite la conversión de saprófitos no simbióticos en endosimbiontes fijadores de N<sub>2</sub> de plantas y viceversa en un solo paso. Los genomas de los rizobios parecen ser muy dinámicos ya que poseen dentro de las regiones que codifican las funciones simbióticas, muchas secuencias de inserción, transposasas y genes relacionados (Kaneko *et al.*, 2002, Sullivan *et al.*, 2002). En el caso de

*Mesorhizobium* se ha podido demostrar la capacidad de estas bacterias para transferir islas simbióticas cromosómicas a otras bacterias del suelo (Sullivan y Ronson, 1998).

Las filogenias establecidas con los genes simbióticos como *nifH* o *nodABC* a menudo difieren de las basadas en otros genes cromosomales (Laguerre *et al.*, 2001), lo que se explica por eventos de transferencia horizontal de genes como los referidos más arriba.

### **2.1.2. Fijación en vida libre por cianobacterias**

Durante la evolución del planeta, las cianobacterias co-evolucionaron con los estados de oxidación cambiantes del océano y la atmósfera para acomodar dentro de una misma célula o colonia, la fotosíntesis oxigénica con la sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa. Estas estrategias adaptativas comprenden en forma simplificada la separación espacial o temporal de la fotosíntesis y la FBN. En 1968, Fay *et al.* propusieron que las condiciones reductoras presentes en un tipo de célula de algunas cianobacterias, “heterocistos“, serían adecuadas para que ocurriera la FBN. En 1973, Fleming y Haselkorn aislaron por primera vez la nitrogenasa de los heterocistos y desde ese momento los consideraron como modelo de una fijación de N<sub>2</sub> exitosa dirigida por la luz. Desde entonces se ha avanzado considerablemente en la comprensión de los mecanismos implicados en la diferenciación y funcionamiento del heterocisto (Flores y Herrero, 2010).

#### **2.1.2.1. Heterocisto**

Los heterocistos son células especializadas en la FBN que se encuentran en las terminaciones de los tricomas o intercaladamente. Se diferencian a partir de células vegetativas, cuando el nitrógeno combinado en el medio que las rodea disminuye considerablemente (Castenholz, 2001). Su desarrollo comienza cuando la división celular cesa, luego le sigue la formación de la envoltura celular del heterocisto, formada por una capa de glicolípidos que se encuentra entre una capa externa de polisacáridos y la pared celular, y constituye una barrera para el ingreso de oxígeno. En los poros polares de los heterocistos maduros se acumulan gránulos de cianoficina, un co-polímero de arginina y ácido aspártico, no sintetizado ribosomalmente, que actúa como reserva de nitrógeno. A su vez, los heterocistos

maduros muestran en general, una disminución de la concentración de ficobiliproteínas, pero su característica fisiológica principal es la presencia de actividad nitrogenasa. Con el fin de preservar la actividad de dicha enzima, la tasa de respiración de estas células es más alta debido a una mayor actividad de la vía de las pentosas fosfato que en las células vegetativas. A su vez, las proteínas citocromo oxidasa y la oxidasa respiratoria terminal alternativa son importantes tanto para la respiración como para la FBN (Xu *et al.*, 2008). El interior de los heterocistos es microaeróbico, como resultado del incremento de la respiración, inactivación del fotosistema productor de oxígeno (PSII), y la formación de una envoltura celular engrosada (Xu *et al.*, 2008).

HetR, el producto de expresión del gen *hetR*, en coordinación con otro factor de transcripción (NtcA), actúa como el regulador principal del desarrollo de los heterocistos. Mutaciones en el gen *hetR*, impiden el desarrollo de los heterocistos, mientras que la sobreexpresión del mismo gen causa la formación de múltiples heterocistos contiguos, y lleva a su vez, a la diferenciación de los heterocistos en presencia de N fijado.

La FBN es muy costosa energéticamente, para hacer frente a dicho coste los carbohidratos sintetizados en las células vegetativas se movilizan hacia los heterocistos, probablemente en forma de sacarosa; a su vez los heterocistos transportan hacia las células vegetativas el N fijado en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1994). El factor de transcripción NtcA participa en la regulación controlando la expresión de la mayoría de los genes involucrados en el metabolismo del N. La diferenciación del heterocisto en respuesta a la acumulación de 2-oxoglutarato es mediada por la unión de este a NtcA (Laurent *et al.*, 2005). En *Anabaena*, NtcA se une a las regiones promotoras de varios genes involucrados en la asimilación del N, en el desarrollo de los heterocistos, o en la fotosíntesis (Herrero *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista agrícola debe destacarse que las cianobacterias diazotrofas son las principales contribuyentes de la FBN fotodependiente en el cultivo de arroz y, dentro de ellas, las formadoras de heterocistos son las más ubicuas (Vaishampayan *et al.*, 2001). El hecho de que las cianobacterias sean organismos fijadores de nitrógeno capaces de generar su propio fotosintato las hace especialmente atractivas

para ser usadas como biofertilizante. El nitrógeno fijado por las cianobacterias puede ser liberado al medio y quedar disponible para la planta de arroz a partir de la autólisis y descomposición de las células y, en algunas especies, ser excretado en forma de amonio o pequeños polipéptidos en la etapa vegetativa (Sinha y Häder, 1996).

### **2.1.3. Métodos de estimación de la actividad nitrogenasa**

La detección experimental de la actividad fijadora de  $N_2$  no siempre es sencilla, y necesita condiciones especiales para cada especie y situación experimental. El método más simple para estimar la FBN en simbiosis con una leguminosa forrajera es comparar la producción de materia seca de la parte aérea de plantas inoculadas y no inoculadas crecidas en un sustrato sin nitrógeno (Neira, 1995).

La enzima nitrogenasa, además de catalizar la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ , puede reducir otros sustratos con triple enlace como el acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ). En esto se basa el método de estimación de actividad nitrogenasa basado en la reducción de acetileno, en el que el etileno producido es detectado y cuantificado por cromatografía de gases. Si bien esta técnica da una idea puntual de la capacidad fijadora y no de la actividad en el tiempo y tiene limitaciones para su interpretación, es útil a efectos comparativos en un mismo experimento (Zehr y Montoya, 2007) y ha servido para identificar cepas de rizobios con alta actividad nitrogenasa y alta producción de biomasa aérea del macrosimbionte (Sassi-Aydi *et al.*, 2012, Silva Pinto *et al.*, 2007).

La FBN también puede estimarse empleando isótopos estables del nitrógeno. El  $^{15}N$  se usa como trazador isotópico, ya que presenta mínimas diferencias de propiedades físico-químicas respecto al  $^{14}N$ . La relación de estos isótopos en la atmósfera es 0,3663 y 99,634 % respectivamente. Entre las técnicas isotópicas se encuentran métodos basados en la dilución isotópica de  $^{15}N$  y en la abundancia natural de este. La dilución isotópica permite evaluar el aporte de la FBN producto de la dilución de una fuente de N enriquecida en  $^{15}N$ . En este tipo de ensayos la concentración de cada isótopo se determina por espectrometría de masas.

El método de la abundancia natural se basa en las pequeñas diferencias de abundancia de  $^{15}\text{N}$  presente en la mayoría de los suelos, respecto al presente en el  $\text{N}_2$  atmosférico (Ledgard y Steele, 1992). Considerando que el N del suelo es generalmente más abundante en  $^{15}\text{N}$  que el  $\text{N}_2$  atmosférico, se asume que plantas no asociadas a simbiosis con fijadores de N, en las cuales la fuente primaria de este elemento es el suelo, tendrían más  $^{15}\text{N}$  que las asociadas que toman el  $\text{N}_2$  de la atmósfera y del suelo.

## 2.2. DESNITRIFICACIÓN

La desnitrificación es el principal proceso biológico responsable de la devolución a la atmósfera del nitrógeno fijado. En este proceso el nitrato es reducido a nitrito por la nitrato reductasa de membrana (Nar) o periplásmica (Nap) (Fig. 2.4). La nitrito reductasa (Nir) cataliza la reducción de nitrito a óxido nítrico y en la reducción de este último a óxido nitroso interviene la óxido nítrico reductasa (Nor). Finalmente el  $\text{N}_2\text{O}$  es convertido en  $\text{N}_2$  por la óxido nitroso reductasa (Nos).

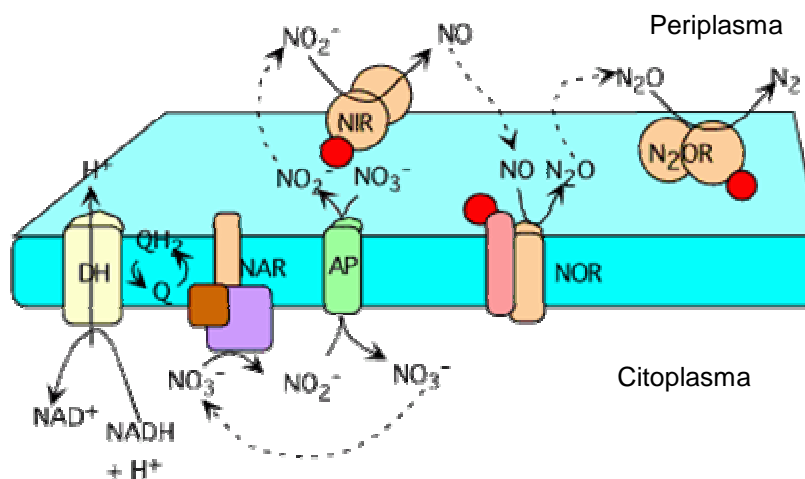


Figura 2.4. Organización de las enzimas vinculadas a la desnitrificación en *P. denitrificans*. AP: antiporte, NAR: nitrato reductasa, NIR: nitrito reductasa, NOR: óxido nítrico reductasa,  $\text{N}_2\text{OR}$ :  $\text{N}_2\text{O}$  reductasa, DH: NADH deshidrogenasa. Modificado de Zumft (1997)

Además de ser responsable de la pérdida de nitrato del suelo, esta vía contribuye a modificar la química atmosférica por la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ , un gas con efecto

invernadero (Lashof y Ahuja, 1990) y capaz de destruir la capa de ozono (Waibel et al., 1999). Otro de los gases producidos en el proceso es el óxido nítrico (NO), que constituye normalmente una porción muy baja de los gases emitidos, ya que para su propia sobrevivencia los microorganismos desnitrificantes normalmente mantienen sincronizadas las actividades de las enzimas Nir y Nos (Murray y Knowles, 2004).

Los suelos son las mayores fuentes de  $N_2O$  atmosférico, que corresponde a un 6% del efecto invernadero total (IPCC, 2007). Se ha estimado que la volatilización de N producto de la desnitrificación, puede representar hasta un 5% del  $N-NO_3$  disponible  $d^{-1}$  en suelos muy pesados o con drenaje pobre (Nielsen, 2006).

### **2.2.1. Procesos por los que se produce $N_2O$ en los suelos**

Los procesos involucrados en la producción de  $N_2O$  se resumen en la figura 2.5 e incluyen la desnitrificación y la nitrificación:

#### **A. Desnitrificación** (o desnitrificación respiratoria)

Es la reducción microbiológica de nitrato a nitrito y luego a productos gaseosos,  $N_2O$  y  $N_2$ . Ocurre bajo condiciones predominantemente anóxicas cuando bacterias anaerobias facultativas usan en la respiración nitrato o nitrito como aceptor final de electrones. El producto final de la desnitrificación es  $N_2$ , pero en algunas circunstancias la reducción es incompleta y puede acumularse  $N_2O$ . Como este es un intermediario en la desnitrificación, puede producirse y consumirse simultáneamente, y el balance entre ambos procesos determina su emisión desde el suelo. La principal enzima responsable de la producción de  $N_2O$  en diferentes ambientes es la NO reductasa respiratoria presente en bacterias desnitrificantes y en algunos oxidadores de amonio (desnitrificación nitrificante).

#### **B. Nitrificación**

La nitrificación es la oxidación microbiológica de amonio a nitrito y finalmente a nitrato. Normalmente es llevada a cabo por bacterias quimioautótrofas, es decir, que reducen el C inorgánico ( $CO_2$  o  $HCO_3^-$ ) a C orgánico, usando la energía liberada durante la nitrificación.

Recientemente se ha descubierto que este proceso es llevado a cabo también por arqueas, y que este grupo es el más importante en la nitrificación llevada a cabo en el



océano. En suelos la importancia funcional de las arqueas nitrificantes es mas discutida, aunque su número es abundante (Leininger et al., 2006).

El rol de los nitrificantes en la producción de  $N_2O$  puede ser a) directo o b) indirecto.

a) Desnitrificación llevada a cabo por bacterias nitrificantes (desnitrificación nitrificante): Algunos aislamientos de *Nitrosomonas* son capaces de reducir nitrito a  $N_2O$  y aún a  $N_2$  cuando se restringe el oxígeno. Puede liberarse  $N_2O$  como un producto secundario incompletamente oxidado, durante la oxidación del amonio.

b) El nitrato producido durante la nitrificación puede ser desnitrificado. La existencia de micrositios anóxicos en el suelo cerca de sitios mejor aireados, supone que nitrificación y desnitrificación pueden ocurrir simultáneamente.

De todas maneras, la nitrificación no es exclusiva de organismos quimiolitotrofos, y actualmente se considera que los organismos que realizan nitrificación heterotrófica en los suelos son abundantes, aunque difíciles de cultivar (Ferguson *et al.*, 2007).

Otros procesos productores de  $N_2O$  son la quimio-desnitrificación y la desnitrificación por hongos. Aunque algunos autores le atribuyen importancia en algunas situaciones (Hopkins *et al.*, 1997), otros los consideran cuantitativamente despreciables (Laughlin y Stevens, 2002). La desnitrificación fúngica es frecuentemente acompañada de co-desnitrificación en la que se forman especies de  $N_2O$  híbridas formadas por combinación de átomos de N del nitrito con donadores de N como aminas o iminas. El producto final de la desnitrificación llevada a cabo por hongos es el  $N_2O$  ya que carecen la enzima  $N_2O$  reductasa. Shoun *et al.* (2012) consideran que la acidificación de un ambiente por lluvia ácida y el uso excesivo de fertilizantes amoniacales pueden promover la desnitrificación por hongos y por lo tanto la emisión de  $N_2O$ . Prendergast-Miller *et al.* (2011) demostraron que especies de hongos ectomicorrícicos tienen capacidad de producir  $N_2O$ . Aproximaciones isotopológicas (Sutka *et al.*, 2008) permitirían estimar cuánto  $N_2O$  proviene del metabolismo de hongos o de bacterias.

También se ha demostrado la producción de  $N_2O$  por bacterias que realizan la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (DNRA) (Xiong *et al.*, 2007). Este

proceso es realizado en anaerobiosis en diferentes ecosistemas incluidos los arrozales.

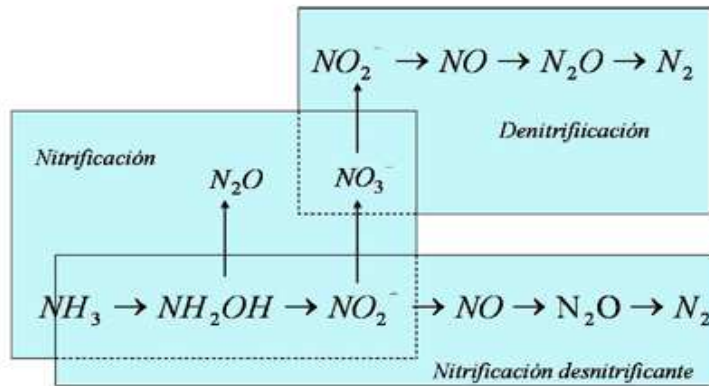
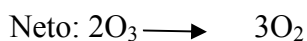
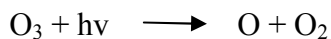
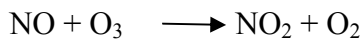
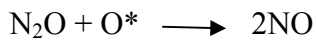


Figura 2.5. Vías de formación de N<sub>2</sub>O (modificado de Wrage *et al.*, 2001)

### 2.2.2. Consumo de óxido nitroso

El único mecanismo significativo para eliminar el N<sub>2</sub>O troposférico es su transporte a la estratósfera donde es fotooxidado a NO, el cual reacciona con el ozono. Las reacciones se resumen a continuación:



Existe sin embargo un mecanismo de consumo de N<sub>2</sub>O en el suelo que se da cuando organismos desnitrificantes transforman N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub> por acción de la enzima N<sub>2</sub>O reductasa. Chapuis-Lardy *et al.* (2007) señalan que flujos de N<sub>2</sub>O negativos aparecen en muchas condiciones, por ejemplo en suelo bajo bosque (Goossens *et al.*, 2001). Sin embargo los factores que regulan el consumo de N<sub>2</sub>O por los suelos no se

comprenden cabalmente y continúan estudiándose (Snyder *et al.*, 2007). La enzima N<sub>2</sub>O reductasa que es la responsable del consumo de N<sub>2</sub>O pierde actividad al ser expuesta brevemente al oxígeno. Si bien muchos microorganismos poseen todas las enzimas responsables de que la desnitrificación prosiga hasta N<sub>2</sub>, *Agrobacterium tumefaciens* y muchas cepas de diferentes géneros de procariotas desnitrificantes carecen de *nosZ* y por lo tanto son incapaces de reducir N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> (Thomson *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios se han realizado en bacterias Gram-negativas aunque actualmente se conocen Gram-positivas desnitrificantes del género *Bacillus* (Jones *et al.*, 2011).

### **3. FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LOTUS**

En este capítulo se integran tres artículos referidos a los rizobios que nodulan *Lotus* sp. y se aporta información complementaria.

El objetivo general de estos trabajos fue conocer la diversidad de las poblaciones de rizobios nativos-naturalizados que establecen simbiosis con diferentes especies de lotus presentes en suelos de Uruguay y buscar cepas adecuadas para ser usadas como inoculantes.

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar aislamientos nativos de rizobios que nodulan *Lotus subbiflorus*
- Estudiar si los rizobios que nodulan distintas especies de Lotus son capaces de desnitrificar, además de fijar N<sub>2</sub>
- Caracterizar la diversidad genética y la efectividad de aislamientos de rizobios de *L. corniculatus* de dos regiones de Uruguay con diferentes niveles de lluvia previa, contenido de agua del suelo e historia de inoculación

Artículos anexados y contribución a los mismos:

- I. Irisarri P, Milnitsky F, Monza J, Bedmar E. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. Plant and Soil 180: 39-47.

Participé en el trabajo de laboratorio, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: Los rizobios fueron caracterizados bioquímica, inmunológica y genéticamente. Se ensayó su eficiencia simbiótica. Esta caracterización contribuyó a la selección de la cepa nativa que se usa actualmente en los inoculantes para *Lotus subbiflorus*.

- II. Monza J, Irisarri P, Díaz P, Degado MJ, Mesa S, Bedmar E. 2006. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. Antonie van Leeuwenhoek 89: 479-484.

Participé en parte del trabajo de laboratorio y parte de la escritura del artículo.

Principales resultados: El análisis de la secuencia del 16SrDNA permitió identificar los aislamientos que nodulaban *L. corniculatus* como *Mesorhizobium* y los que nodulaban *L. subbiflorus* como *Bradyrhizobium*. Estos últimos poseían genes de las distintas reductasas que participan de la desnitrificación así como actividad desnitrificante. En los mesorhizobios en cambio, no se detectó actividad desnitrificante pese a poseer genes de un tipo de nitrito reductasa.

**III.**Sotelo M, Irisarri P, Lorite MJ, Casaretto E, Rebuffo M, Sanjuán J, Monza J. 2011. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology* 49: 197-207. (Los dos primeros autores contribuyeron por igual al artículo).

Participé en el trabajo inicial de laboratorio de aislamiento de rizobios, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: Los índices de diversidad de los aislamientos fueron altos y no difirieron entre N y S del país, ni entre sitios con historia de inoculación o no. Al analizar las secuencias 16S rRNA, ITS y *atpD*, la mayoría de las cepas aisladas se agrupaban con *M. huakuii* y no con *M. loti*, contrariamente a lo que ocurría con los genes simbióticos. La eficiencia simbiótica de algunos aislamientos fue similar a la del inoculante comercial que no se aisló de ninguno de los nódulos colectados.

Estos artículos se citan en el capítulo con la letra romana correspondiente y se adjuntan en el anexo.

### **3.1. LEGUMINOSAS FORRAJERAS**

Las leguminosas son importantes para la producción de carne y leche desde hace siglos y juegan un rol clave en el ecosistema al aumentar el contenido de nitrógeno del suelo como resultado de la FBN en simbiosis con los rizobios específicos. Cuando las leguminosas se manejan adecuadamente son fuente de proteínas, minerales como Mg y Ca, fibras y energía (Carámbula, 2003). Además de su valor nutritivo, las leguminosas forrajeras contribuyen a la sostenibilidad de la rotación, reducen la erosión y los requerimientos de fertilización, mejoran la estructura del suelo y aumentan la materia orgánica (Rebuffo *et al.*, 2006). A su vez, en sistemas de producción ganaderos mejoran la sincronización y acortan los ciclos reproductivos, de recría y engorde, lo que se traduce en una mejora en el ingreso neto del predio para todos los modelos estudiados (Rebuffo *et al.*, 2005).

El cultivo de leguminosas forrajeras en Uruguay se ha visto afectado como consecuencia de la expansión del área agrícola que genera un desplazamiento a suelos menos productivos y con mayores limitaciones (Ayala *et al.*, 2007). Para esos suelos es necesario contar con cepas de rizobios que puedan ser usadas como inoculantes eficientes que faciliten la implantación y producción del cultivo.

#### **3.1.1. Leguminosas forrajeras del género *Lotus***

El género *Lotus* incluye más de 200 especies perennes y anuales que viven en diferentes hábitats (Grant, 1995). Estas leguminosas presentan buena adaptación a suelos con baja disponibilidad de fósforo, y tienen taninos condensados que confieren a la planta resistencia a enfermedades y al ataque de insectos, y en los animales reducen la presencia de parásitos gastrointestinales y previenen el meteorismo (Min *et al.*, 2003). De esta forma, los taninos condensados mejoran el aprovechamiento de proteínas del forraje por los rumiantes y reducen las emisiones de metano y de amoníaco en el estiércol (MacAdam *et al.*, 2006).

La incorporación de leguminosas del género *Lotus* a la pastura produce cambios significativos en dos aspectos. Por un lado, aumenta la disponibilidad del forraje estacional del campo natural y por otro también puede aumentar su contenido

proteico. Rebuffo *et al.* (2005) estimó incrementos de 7 a 18 kg de materia seca (MS)·ha<sup>-1</sup>·día<sup>-1</sup> en invierno y de 15 a 31 kg de MS · ha<sup>-1</sup> · día<sup>-1</sup> en primavera; y el contenido de proteína cruda también aumentó, con valores que pasaron de 9 a 18%.

Las cuatro especies domesticadas usadas en el mejoramiento de praderas en nuestro país son *Lotus corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* (Batista, 2013, Díaz *et al.*, 2005). Entre las cuatro especies se siembran en Uruguay alrededor de 500.000 ha (DIEA, 2011) en sistemas ganaderos, agrícola-ganaderos y lecheros. En esta tesis los rizobios estudiados son los simbioses de *L. corniculatus*, *L. uliginosus* y *L. subbiflorus*.

*L. corniculatus* es la especie de Lotus de mayor importancia agronómica y de más amplia distribución (Díaz *et al.*, 2005) y se ha usado desde la década del 60 en rotaciones con cultivos agrícolas en nuestro país (Hernández *et al.*, 2005). Su sistema radicular profundo hace a esta especie resistente a la sequía.

*Lotus subbiflorus* (= *L. hispidus*) cv Rincón es una leguminosa invernada, preferentemente anual, con buena adaptación a las condiciones ecológicas y de manejo de las áreas ganaderas de Uruguay (Risso y Carámbula, 1998). Se usa para mejoramiento del campo natural.

*L. uliginosus* es una leguminosa perenne estival con muy buena adaptación a las condiciones ecológicas del país integrándose a la vegetación nativa en forma exitosa, lo que permite su uso en mejoramientos extensivos. Se recomienda principalmente para suelos con elevada acidez, excesiva humedad y/o bajos niveles de fósforo (Carámbula *et al.*, 1994). Entre los Lotus perennes cultivados en Uruguay es el de mayor producción en invierno.

En Uruguay, los predios dedicados a la lechería ocupan un área de 750.000 ha con pasturas de leguminosas, principalmente alfalfa, tréboles y lotus, en mezcla con gramíneas (citado por Altier *et al.*, 2013). La ganadería extensiva se realiza sobre “campo natural” mejorado con leguminosas, sobretodo con *Lotus* spp., mayoritariamente *Lotus subbiflorus* (87,6%).

### **3.1.2. Inoculación de leguminosas forrajeras en Uruguay**

La inoculación de leguminosas con rizobio, quizás una de las aplicaciones biotecnológicas más antiguas en la agricultura (Lindström *et al.*, 2010), es una práctica que permite incorporar artificialmente rizobios específicos a la semilla o al suelo (Hardanson *et al.*, 1989). Estos rizobios son seleccionados por su especificidad, infectividad (capacidad de formar nódulos) y efectividad (capacidad de fijar N<sub>2</sub>) (Toresani *et al.*, 2007).

Los trabajos para desarrollar inoculantes en distintos continentes han demostrado la importancia de la diversidad de las poblaciones nativas, tanto para la fijación de nitrógeno como para el éxito de la inoculación (Lindström *et al.*, 2010). Además de su persistencia en el suelo, el éxito de los inoculantes depende de la presencia de rizobios nativos. Estos rizobios muchas veces son más competitivos y ocupan la mayoría de los nódulos, bien sea porque sus poblaciones son más abundantes, por su distribución en el perfil del suelo, o por su mejor adaptación a las condiciones locales (Estrella *et al.*, 2009).

Lindström *et al.* (2010) sostienen que el desafío para la agricultura es encontrar la pareja perfecta leguminosa- rizobio, tanto logrando genotipos vegetales adaptados a las poblaciones locales de rizobios como por inoculación con cepas eficientes adaptadas a las condiciones ambientales locales y con buena capacidad competitiva frente a cepas menos eficientes.

En Uruguay entre 1960 y 1970 se realizó un amplio programa de selección de cepas de rizobios para leguminosas forrajeras así como de soportes para la fabricación de inoculantes, estableciéndose el marco legal para garantizar la calidad de la producción de los mismos por la industria (Labandera, 2007). De acuerdo a Altier *et al.* (2013), en Uruguay el área total cubierta por leguminosas forrajeras sería 2 millones de hectáreas, lo que supone el 15% del área agrícola. Si se considera que una tonelada de urea cuesta aproximadamente U\$S420 y suministra 460 kg de N y la FBN en forrajeras aporta 230 kg de N por ha por año en promedio, la inoculación supone un ahorro de U\$S210 por ha (Montañez *et al.*, 2003). De acuerdo a estas estimaciones, el país ahorraría U\$S420 millones por año en la importación de fertilizantes nitrogenados gracias al empleo de inoculantes (Lindström *et al.*, 2010).



### 3.2. MICROSIMBIOTES DEL GÉNERO LOTUS

Las leguminosas del género *Lotus* establecen en general simbiosis específicas con rizobios de los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. *Lotus corniculatus* y *L. glaber* son noduladas típicamente por bacterias del género *Mesorhizobium* mientras que *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* son noduladas por bacterias del género *Bradyrhizobium* (Díaz *et al.*, 2005; Gregerson *et al.*, 1999). Entre estos grupos de inoculación se han encontrado relaciones de incompatibilidad, en la medida que los rizobios de un género no nodulan en general al otro grupo de inoculación, o bien lo nodulan pero son inefectivos o parásitos (revisado por Camargo, 2012). Una situación de este tipo, con connotaciones prácticas, se da en Uruguay cuando se siembra *L. uliginosus* y/o *L. subbiflorus* en un campo con historia de *L. corniculatus*, dado que se inducen nódulos ineficientes o seudonódulos con cepas de *Mesorhizobium* sp. (Monza *et al.*, 1992). Para solucionar esta situación se intentó usar como inoculante una cepa de origen neozelandés, NZP2037 (U261 en Uruguay), que tiene amplio rango de hospedero y nodula a las cuatro especies de *Lotus* de uso agronómico en nuestro país. Sin embargo esta cepa no logró buen desempeño en campo en ninguno de los hospederos.

Distintos autores (Batista *et al.*, 2012, Hernández *et al.*, 2005) sostienen que los rizobios nativos o naturalizados que nodulan las cuatro especies de *Lotus* de importancia agronómica están generalmente presentes en los suelos de Uruguay. Estos autores consideran que estos suelos tienen una alta concentración de rizobios efectivos, pero si no hay historia previa del cultivo los rizobios presentes tienen alta variabilidad de eficiencia simbiótica.

La caracterización de los rizobios nativos que nodulan *Lotus* empezó hace unos 20 años en Uruguay e incluyó el análisis de las propiedades bioquímicas y genéticas de los aislamientos (Monza *et al.*, 1997 y 1992; Baraibar *et al.*, 1999). Como continuación de esos trabajos en el **artículo I** se caracterizaron rizobios nativos-naturalizados que nodulaban *L. subbiflorus* de acuerdo a características como el tiempo de generación, capacidad de producir ácido y de usar diferentes fuentes de carbono. Los resultados permitieron concluir que la mayoría de los aislamientos de rizobios de *L. subbiflorus* son de crecimiento lento (tiempo de generación mayor a 8

h) y tienen características propias de los bradirizobios: no producen ácido, toleran NaCl, son incapaces de usar celobiosa y melobiosa y no presentan plásmidos. Estas características sumadas a la secuenciación parcial del gen 16S rRNA (**artículo II**) permitieron clasificar estos aislamientos como pertenecientes al género *Bradyrhizobium*.

Para identificar las cepas y evaluar su diversidad se realizó inicialmente una caracterización inmunoquímica y del perfil de proteínas totales. El empleo de todos los parámetros anteriormente mencionados permitió identificar la mayoría de las cepas (**artículo I**). Un estudio posterior de la diversidad genética (Batista *et al.* 2012) usando diferentes genes “housekeeping” individualmente y concatenados, así como genes simbióticos, concluyó que la mayoría de los aislamientos de nódulos de *L. uliginosus* realizados en dos regiones de Uruguay se afilian a *B. japonicum* bv. *genistearum*. Por otro lado, se pudo demostrar también que todos los aislamientos de rizobios que nodulaban *L. subbiflorus* también nodulaban efectivamente *L. uliginosus* (antes *L. pedunculatus*).

La cepa que se usa actualmente en Uruguay para inocular *L. subbiflorus*, U531 (NC3), es una cepa nativa adaptada a suelos ácidos (Lindström *et al.*, 2010). Esto pone en evidencia la importancia de estudiar las poblaciones de rizobios nativas o naturalizadas para seleccionar cepas a usar como inoculantes. Esta cepa además de su eficiencia simbiótica, facilidad para multiplicación industrial y tolerancia a la acidez, fue seleccionada por ser competitiva frente a mesorhizobios presentes en el suelo de plantaciones previas de otros Lotus (Elena Pérez, comunicación personal, 20 de marzo de 2014).

### 3.3. DESNITRIFICACIÓN EN RIZOBIOS

En los últimos años se han encontrado varias especies de rizobios que llevan los genes que codifican para algunas o todas las reductasas responsables de la desnitrificación. La capacidad de desnitrificar se ha detectado en algunos géneros de rizobios en vida libre en condiciones microaeróbicas, en nódulos o en bacteroides aislados (Delgado *et al.*, 2007).

Si bien el proceso comienza con la reducción de nitrato, esta reacción ocurre también en la asimilación y reducción de nitrato asimilatoria, por lo que la reducción del nitrito al primer intermediario gaseoso (NO) catalizado por el sistema de la nitrito reductasa (Nir, Fig. 2.4) se considera la reacción que define la desnitrificación (Mesa *et al.*, 2004). Aunque la capacidad de desnitrificar podría conferir a las bacterias posibilidades de crecer en condiciones anaeróbicas, esta característica no es común entre los rizobios. Solo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son verdaderos desnitrificantes capaces de reducir  $\text{NO}_3^-$  simultáneamente a  $\text{NH}_4^+$  (asimilación) y a  $\text{N}_2$  (desnitrificación) creciendo en condición de ausencia de oxígeno con nitrato como único aceptor final de electrones y fuente de N.

En la secuencia completa del genoma de *M. loti* cepa MAFF303099 no están presentes genes de la desnitrificación (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>). Hasta la publicación del **artículo II** no se sabía de la presencia de genes de la desnitrificación en rizobios que nodulan *L. corniculatus* y *L. subbiflorus*. En ese artículo se evaluó la capacidad de desnitrificar de aislamientos de nódulos de Lotus de rápido y lento crecimiento, pertenecientes a los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, respectivamente. Para ello se usaron fragmentos de los genes *nirK*, *norBQD* y *nosZD* de *B. japonicum* USDA110 como sonda para encontrar genes homólogos en 10 rizobios nativos que nodulaban lotus. Todos los aislamientos hibridaron con la sonda *nirK* mientras que solo los *Bradyrhizobium* presentaron genes homólogos a *norBQD* y *nosZ*. Los aislamientos de *Bradyrhizobium* crecieron en medio microaeróbico con nitrato y produjeron más  $\text{N}_2\text{O}$  después de incubación con acetileno, un inhibidor de la Nos, lo que evidencia que tienen una Nos funcional.

La falta de genes del sistema *nor* coincide con los datos procedentes del análisis de la secuencia de los genomas de *Mesorhizobium loti* cepa MAFF303099 y *Rhizobium leguminosarum* 3841, que mostró que dichas cepas carecen de ortólogos *norC*, *norD* y *norE*, que codifican las subunidades de la NO reductasa (Black *et al.*, 2012).

Casella *et al.* (2006) especularon sobre la presencia de una vía de desnitrificación incompleta en *R. sullae* (similar a la que encontramos en *Mesorhizobium*) que haría que la bacteria permanezca viable, pero en forma no cultivable, que le permitiría sobrevivir en condiciones de estrés y recuperar el estado vegetativo posteriormente.

Por otro lado, la presencia de una nitrito reductasa con Cu le permitiría a la bacteria destoxificar el  $\text{NO}_2^-$  (Delgado *et al.*, 2007).

En simbiosis, los bacteroides dentro de los nódulos también son capaces de expresar la vía desnitrificante y producir los gases NO,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ , dependiendo de que contengan o no todos los genes de la vía de desnitrificación. El proceso no sería muy activo en los nódulos, ya que el  $\text{NO}_3^-$  tiene un acceso limitado a los bacteroides (Delgado *et al.*, 2007).

En los nódulos se necesita lograr un equilibrio entre la concentración de  $\text{O}_2$  necesaria para obtener la energía que permita mantener, además de las necesidades celulares generales, la requerida para la reacción catalizada por la nitrogenasa, y a su vez evitar la inactivación irreversible de la enzima. La zona cortical de los nódulos provee a estos de una barrera de difusión al  $\text{O}_2$ , y el suministro a los bacteroides se da a través de la leghemoglobina (Mathieu *et al.*, 1998). Esas condiciones son también favorables para la desnitrificación, donde la reducción de óxidos de N (Nox) está acoplada a la conservación de energía. De esta forma, bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  podrían usarse para la generación de ATP en los bacteroides, con lo cual la energía disponible para la nitrogenasa aumentaría.

Los bacteroides de *B. japonicum* poseen una oxidasa tipo citocromo  $\text{bb}_3$  de alta afinidad por  $\text{O}_2$ , codificada en el operón *fixNOQP* que permite producir ATP (Delgado *et al.*, 2007). Otro posible papel de la desnitrificación en los nódulos sería la detoxificación de compuestos citotóxicos como  $\text{NO}_2^-$  o NO, no sólo producidos como intermediarios de este proceso sino también generados por la planta huésped.

Hénault y Revellin (2011) confirmaron que soja inoculada con una cepa de *B. japonicum* portadora de genes *nos* era capaz de consumir  $\text{N}_2\text{O}$ , razón por la cual han propuesto que la inoculación sería un mecanismo de mitigación de este gas de efecto invernadero. La emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  proviene del nitrógeno del suelo y del fertilizante, pero en el caso de las leguminosas también de la degradación de los nódulos. Un ensayo reciente en campo mostró que la inoculación de soja con rizobios portadores del gen *nosZ* era capaz de reducir las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  y aún más si la inoculación se hace con cepas mutantes de *B. japonicum* con actividad  $\text{N}_2\text{O}$  reductasa sobrepresada (*nosZ++*) (Itakura *et al.*, 2013). Estos resultados abren un campo

interesante de investigación respecto a la presencia de genes de la desnitrificación en rizobios y vinculan estos resultados con los de emisiones de N<sub>2</sub>O.

### **3.4. DIVERSIDAD DE RIZOBIOS**

La diversidad incluye dos componentes, la riqueza, entendida como el número de especies, y la abundancia relativa de estas últimas (Begon *et al.*, 2006). Para estimar la diversidad se emplean diferentes índices, y uno de los más usados es el índice de Shannon (H) (Shannon y Weaver, 1949).

Si bien los índices son muy usados en estudios de diversidad, tienen algunas limitaciones que dificultan su interpretación. Por ejemplo cuando se usan diferentes métodos para caracterizar con distinto poder discriminatorio, los resultados no son comparables (revisado por Batista, 2013). En última instancia, un índice de diversidad es un número que representa matemáticamente la presencia y abundancia de los miembros de una comunidad, de rizobios en este caso (como se calcula en el **artículo III**), pero no “describe” su capacidad metabólica, la posibilidad de responder a estreses ambientales, ni las interacciones entre ellos o su distribución espacial en la matriz del suelo.

#### **3.4.1. Análisis de la diversidad de rizobios aislados de lotus en suelos de Uruguay**

Hasta el desarrollo de técnicas moleculares, para clasificar los rizobios se consideró además de la leguminosa hospedera, el tiempo de generación y la capacidad de acidificar o alcalinizar el medio de cultivo (Monza *et al.*, 1992). Entre las características para identificar cepas de rizobios también se han usado la resistencia a antibióticos (Alexandre *et al.*, 2006), el perfil de lipopolisacáridos (LPS) de la pared (Santamaría *et al.*, 1999), la producción de pigmentos como melanina (Cubo *et al.*, 1988), serología, etc. El perfil de plásmidos y el de proteínas totales también se han usado para identificar cepas (Monza *et al.*, 1992). Cada una de estas metodologías presentan distintas limitaciones y diversa capacidad discriminatoria (Batista, 2013).

Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden generar patrones llamados fingerprints de ADN (literalmente huellas dactilares de ADN) que se usan

para establecer la diversidad genética dentro de las poblaciones de bacterias en general. Este método se basa en la variación genética en las secuencias blanco localizadas en los genomas, que sirven como sitios de unión de los cebadores, de esta manera la PCR genera fragmentos de diferentes tamaños. El ADN puede ser amplificado con cebadores dirigidos a diferentes secuencias; por ejemplo cebadores sencillos para las secuencias BOX, cebadores al azar en los RAPD, o pares de cebadores para distintos tipos de secuencias como son secuencias repetidas extragénicas palindrómicas (REP) o secuencias consensos intergénicas repetidas de enterobacterias (ERIC) (de Bruijn, 1992). Estos métodos son útiles para detectar la diversidad genética y para el agrupamiento de las cepas.

En bacterias, los genes 16S ARNr y 23S ARNr y la secuencia espaciadora (ITS) ARN 16S- ARN 23S, se usan frecuentemente como marcadores moleculares para estudios filogenéticos. En el caso del gen 16S ARNr, al ser muy conservado, a veces no es posible la determinación a nivel de especie al comparar las secuencias con las depositados en un banco de datos de genes. Una alternativa es digerir los productos del gen 16S sintetizados por PCR y analizar el polimorfismo en los tamaños de los fragmentos de restricción (RFLP) por electroforesis (ARDRA: análisis de la restricción del ADN ribosomal amplificado). El análisis de estos patrones se ha usado para la identificación taxonómica de rizobios (Lorite *et al.*, 2012, Vandamme *et al.*, 1996). Con este análisis se identificaron 4 ribogrupos distintos para los 104 aislamientos de nódulos de *L. corniculatus* con diferente perfil ERIC (**artículo III**). La mayoría de los aislamientos (más del 80%) junto al inoculante comercial pertenecen al mismo ribogrupo y no se observó una distribución diferencial de los patrones de ARDRA entre las 2 zonas del país estudiadas. Batista *et al.* (2012) analizando rizobios aislados de nódulos de *L. uliginosus* encontraron que el 95% de los aislamientos tenían el mismo perfil de ARDRA. De todas formas, esta metodología aplicada individualmente es poco sensible para estudiar diversidad de rizobios que nodulan un determinado hospedero.

Por otra parte, la secuencia ITS localizada entre los rDNA 16S y 23S tiene variaciones importantes en cuanto a longitud y secuencia nucleotídica a nivel de género y especie (van Berkum y Fuhrmann, 2000). Algunos genes “domésticos”

(*housekeeping*) que están ampliamente distribuidos entre taxones, presentan copia simple y están distribuidos en todo el genoma, se usan en estudios filogenéticos. Entre los “housekeeping” se encuentran los genes *atpD*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB* (Vinuesa *et al.*, 2008).

El objetivo del **artículo III** fue caracterizar la diversidad y eficiencia simbiótica de rizobios aislados de nódulos de *L. corniculatus* de dos regiones de Uruguay, con diferentes niveles de lluvias, y distintos contenido de agua disponible en el suelo e historias de inoculación (con y sin inocular). El análisis del patrón de ERIC-PCR del total de los aislamientos mostró una diversidad alta, del orden del 60%. Los índices de diversidad y riqueza fueron similares para ambas regiones estudiadas y tampoco se observaron diferencias en la diversidad entre suelos previamente inoculados o no.

En el **artículo III**, y a partir del análisis de secuencias de 16S rRNA, ITS y *atpD* se concluyó que los aislamientos del ribogrupa I, el mayoritario, agrupaban con *M. huakuii*, aquellos de los ribotipos II y III con *M. caraganae* y el ribotipo IV con *M. septentrionale*. Estrella *et al.* (2009) también encontraron aislamientos de *M. huakuii* partiendo de nódulos de *L. tenuis* en Argentina. Ninguno de los aislamientos ni el inoculante comercial agruparon con la cepa tipo de *Mesorhizobium loti* NZP2213. En otros países se encontraron resultados similares, donde *M. loti* era infrecuente o estaba ausente (Lorite *et al.*, 2010a, Estrella *et al.*, 2009, Han *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo sugieren que *M. loti* no estaría adaptada a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país, ya que no se encontró en ninguna de las zonas analizadas.

A pesar de que ninguno de los aislamientos de suelos de Uruguay (**artículo III**) pudo identificarse como *M. loti*, las secuencias de los genes simbióticos como *nodC* (que codifica para la quitina sintetasa que produce el esqueleto específico de los factores Nod) y *nifH*, sí agrupaban con la cepa tipo NZP2213 de *M. loti* y con otros aislamientos de *L. corniculatus* y *L. tenuis* de España e Islas Canarias (Lorite *et al.*, 2010a, 2010b). Genes simbióticos similares son compartidos entonces por especies separadas por el rRNA 16S. Este hecho sugiere que los genes simbióticos de los rizobios que nodulan *L. corniculatus* tendrían un origen común y la transferencia horizontal de genes jugaría un papel importante en la expansión de capacidad

simbiótica entre las especies de *Mesorhizobium* (Sullivan *et al.*, 2002). En el caso de *M. loti* cepa R7A, se ha estudiado en profundidad su “isla simbiótica” que es un elemento integrativo conjugativo (ICE) de 501,8 kb transferible a mesorizobios no-simbióticos y se denomina ICEM/Sym<sup>R7A</sup> (Ramsay *et al.*, 2006). Los ICE son elementos genéticos móviles que codifican la maquinaria para la conjugación, así como los sistemas regulatorios que controlan la escisión del cromosoma y la transferencia conjugativa y se integran adyacentes a genes estables como los de tRNA (Wozniak y Waldor, 2010). Sin embargo, la mayoría de las islas genómicas parecen haberse anclado permanentemente en su ADN hospedero y perdido la capacidad de transferencia (Dobrindt *et al.*, 2004).

A pesar de que la cepa U510 se usa como inoculante comercial para *L. corniculatus* desde 1972 (Labandera *et al.*, 1982), la caracterización genotípica de esta cepa australiana no se había realizado hasta ahora (**artículo III**). De acuerdo a ella, el inoculante comercial es un *M. huakuii* bv *loti*. Si bien esta cepa presentaba un perfil ERIC único, los perfiles más relacionados al suyo quizás representen derivados de la misma que hayan experimentado rearrreglos génicos desde su liberación al suelo hace 30 años. Por otro lado, los aislamientos con perfiles muy diferentes pertenecerían a cepas nativas o naturalizadas posiblemente introducidas con las semillas.

De uno de los sitios sin historia de inoculación estudiados en este **artículo III** se aisló de nódulo la cepa S658, perteneciente al género *Phyllobacterium* (Sánchez *et al.*, 2013). Hasta ahora no habían sido reportados *Phyllobacterium* en nódulos de *Lotus*, aunque sí que nodulaban tréboles. *Phyllobacterium trifolii* fue aislado de nódulos de *Trifolium* y *Lupinus* en España (Valverde *et al.*, 2005). Recientemente se ha propuesto como nueva especie *Phyllobacterium endophyticum*, aislado de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, pero sin capacidad de formar nódulos con esta leguminosa (Flores-Félix *et al.*, 2013).

También se consideraron en este trabajo (**artículo III**) características como la eficiencia simbiótica de estos rizobios en *L. corniculatus*. Dichas características no mostraron correlación con los diferentes ribogrupos, pero sus resultados evidenciaron la presencia de diversos rizobios nativos con la misma eficiencia simbiótica que el inoculante comercial, porque producían la misma cantidad de biomasa aérea. De los



168 aislamientos efectivos en *L. corniculatus*, 40 se ensayaron con *L. uliginosus* como macrosimbionte y sólo 5 indujeron nódulos que permitían el desarrollo de una planta saludable 65 días después de la inoculación.

En un artículo reciente, Mainaud *et al.* (2012) aislaron cepas de *Aminobacter* de nódulos de *Anthyllis vulneraria* con secuencias *nodA* estrechamente relacionadas con *M. loti* y propusieron una nueva especie, *Aminobacter anthyllidis*. En 2011, Ampomah y Huss-Danell comunicaron que estudiando la diversidad genética de las bacterias aisladas de nódulos de *Lotus corniculatus* y *Anthyllis vulneraria* en Suecia encontraron cepas de *Rhodococcus* spp., *Geobacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. que llevaban secuencias *nodA* típicas de *M. loti*. Estos aislamientos eran efectivos al reinocular con ellos Lotus.

Un análisis similar se ha realizado en otros sistemas, como es el caso de poroto en el que entre los aislamientos de los nódulos, se encontraron además de cepas muy eficientes en la fijación de nitrógeno, cepas de *Leifsonia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* y *Enterobacter* (Cardoso *et al.*, 2012). Estos últimos géneros se habían aislado muchas veces como endófitos capaces de fijar nitrógeno y promover el crecimiento vegetal, pero nunca se habían aislado a partir de nódulos.

Estas evidencias demuestran que los rizobios son filogenética y fisiológicamente diversos y parece que la adquisición del estilo de vida simbiótico debe haber ocurrido repetida e independientemente por transferencia horizontal de funciones claves (particularmente las secuencias génicas *nod* y *nif*) a bacterias del suelo, convirtiéndolas en simbioses (Masson-Boivin *et al.*, 2009). La movilización de islas simbióticas de *M. loti* ha sido demostrada en condiciones de campo, y el mecanismo subyacente ha sido analizado en ensayos de laboratorio (Ramsay *et al.*, 2006).

### **3.4.2. Factores que afectan la diversidad de rizobios**

La diversidad de la población de rizobios existente en un hábitat determinado puede deberse bien a la evolución de las poblaciones *in situ* o al transporte de cepas desde otro hábitat. En general se puede suponer que habrá una combinación de ambas causas. Wang y Chen (2004) proponen tres maneras en que los rizobios puedan transportarse largas distancias: por la introducción de semillas o plantas

acompañadas de sus rizobios, por aplicación de inoculantes y por los ríos que arrastran rizobios corriente abajo. De esta forma los rizobios se trasladan pasivamente y deben enfrentarse a los factores bióticos y abióticos presentes en el nuevo ambiente. El éxito en la colonización de otro ambiente depende de su hospedero y de factores ambientales. Estos autores sostienen que la colonización por los rizobios será más fácil si el ambiente nuevo es similar al anterior y si las leguminosas huéspedes no son promiscuas. De cualquier manera, una migración de rizobios exitosa puede afectar la comunidad microbiana local por el establecimiento de una población bacteriana nueva y por la transferencia horizontal de genes, entre los que pueden estar los simbióticos (Sullivan y Ronson, 1998).

Existen múltiples factores abióticos que pueden afectar la diversidad de determinado rizobio en un suelo, entre los que se encuentran el laboreo del mismo, pH, contenido de materia orgánica, fertilización, presencia de metales pesados entre otros contaminantes. Castro *et al.* (2003) reportaron que la presencia de metales pesados disminuye la diversidad de rizobios, sin embargo Laguerre *et al.* (2006) en suelos con exceso de cobre solo encontraron disminución del número de rizobios pero no de la diversidad. A su vez, Estrella *et al.* (2009) observaron menor diversidad de rizobios nodulando *L. tenuis* en suelos salinos y alcalinos respecto a suelos con condiciones menos estresantes.

También el laboreo del suelo puede generar ambientes diferentes, con distinto contenido de humedad y disponibilidad de nutrientes para los microorganismos edáficos. En ese sentido Kaschuk *et al.* (2006) comunicaron una mayor diversidad de rizobios que nodulaban *Phaseolus vulgaris* bajo siembra directa respecto al laboreo convencional. También en relación a prácticas de laboreo, Caballero-Mellado y Martínez-Romero (1999) encontraron que la fertilización de un suelo virgen disminuye la diversidad de rizobios. Además de estos factores, sin duda la historia previa de un cultivo hospedero es relevante para la presencia y diversidad de un rizobio específico. En el **artículo III** no se encontró que la diversidad de rizobios nodulando *L. corniculatus* fuera diferente entre las dos regiones del Uruguay muestreadas que presentaban diferentes tipos de suelos y distinta disponibilidad de agua.

Por otra parte, la adaptación de los rizobios nativos a su ambiente resulta en niveles altos de competencia saprofítica (Zengeni *et al.*, 2006). Las cepas de rizobios nativos pueden ser muy abundantes en un suelo y competir con las cepas inoculadas, razón por la que estas últimas deben seleccionarse también por su competitividad por la nodulación.

#### **4. FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR CIANOBACTERIAS Y FERTILIZACIÓN EN ARROZ**

Este capítulo contextualiza 4 artículos y un capítulo de libro sobre cianobacterias con heterocisto aisladas de suelos de arrozal de la zona Este del Uruguay: su diversidad y abundancia, los efectos de la fertilización y herbicidas, la inoculación con aislamientos nativos y el efecto de la luz UV-B sobre ellas.

Para conocer la situación de las cianobacterias con heterocisto en el agroecosistema referido, y cómo distintos factores de manejo podrían estar afectándola, la hipótesis manejada fue que la independencia trófica, sumada a la adaptación a las condiciones ambientales de dónde se aislaron, los haría útiles para ser usados como biofertilizante que permitiría disminuir el aporte de N mineral.

Las principales preguntas planteadas fueron:

- ¿Pueden aislarse cianobacterias heterocísticas en suelos de arrozal templado y en rotación con pasturas?
- ¿Cuán abundante y diversa es la población de cianobacterias cultivables a lo largo del ciclo de cultivo del arroz y cuáles son los géneros más abundantes?
- ¿Cuánto N<sub>2</sub> es fijado por la microflora fotosintética a lo largo del ciclo del arroz?
- ¿Cuál es el efecto de la fertilización nitrogenada sobre la fijación tanto *in situ* como sobre aislamientos de cianobacterias?
- ¿Es afectada la fijación por cianobacterias por herbicidas normalmente empleados en arrozales?
- ¿Cuáles son las potencialidades y limitaciones del empleo de cianobacterias como biofertilizantes?
- ¿Contribuye la inoculación con cianobacterias nativas a la nutrición nitrogenada del arroz?
- ¿Cuál es la eficiencia de uso del fertilizante mineral aplicado a la siembra o fraccionado?
- ¿Cuál es la velocidad de mineralización del nitrógeno cianobacteriano?

¿Cómo es la respuesta frente a la luz UV-B de distintas cianobacterias?

Publicaciones anexadas y contribución a las mismas:

**IV.** Irisarri P, Gonnet S, Deambrosi E, Monza J. 1999. Diversidad de cianobacterias con heterocistos en suelos cultivados con arroz. *Agrociencia* 3: 1-7.

Participé en la redacción del proyecto, el trabajo de campo y laboratorio, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: Las cianobacterias con heterocistos cultivadas fueron diversas con predominio del género *Nostoc*. El mayor número se encontró unas 8 semanas después de inundado el cultivo. Se obtuvo una colección de cianobacterias aisladas que se conserva liofilizada.

**V.** Irisarri P, Gonnet S, Monza J. 2001. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: Diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *Journal of Biotechnology* 91: 95-103.

Participé en la redacción del proyecto, el trabajo de campo y laboratorio, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: La densidad de cianobacterias con heterocisto encontrada fue menor a la reportada para arrozales tropicales y disminuyó con el agregado de fertilizante. La actividad nitrogenasa fotodependiente fue baja y aumentó solo al final del ciclo del cultivo, sin efecto de la fertilización. La actividad nitrogenasa *in vitro* de dos cianobacterias disminuyó con altas dosis de propanil y en presencia de amonio, mientras que no se afectó por el agregado de quinclorac.

**VI.** Irisarri P. 2006. Role of cyanobacteria as biofertilizers: Potentials and Limitations. En: *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Rai MK. (Ed.). New York: The Haworth Press Inc. 417-432.

Redacté el capítulo a solicitud del editor.

Principales resultados: Las potencialidades de un manejo integrado de la fertilidad del suelo y del empleo de biofertilizantes en la agricultura orgánica son señalados. Entre las limitaciones para el empleo de las cianobacterias como biofertilizantes se indica el desconocimiento de los factores que promueven o modulan el incremento de su biomasa.

**VI.** Irisarri P, Gonnet S, Deambrosi E, Monza J. 2007. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 237-242.

Participé en la redacción del proyecto, el trabajo de campo y laboratorio, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: La inoculación con aislamientos nativos de cianobacterias junto a la inundación no afectó el rendimiento ni la recuperación de N del fertilizante por la planta. La eficiencia de uso del fertilizante por la planta se duplicó al fraccionar la dosis a la siembra, al macollaje y a la iniciación de la panoja. La mineralización de las cianobacterias fue rápida en condiciones controladas.

**VII.** Pérez G, Doldán S, Borsani O, Irisarri P. 2012. Differential response to moderate UV-B irradiation of two heterocystous cyanobacteria isolated from a temperate ricefield. *Advances in Microbiology* 2: 37-47.

Redacté el proyecto, orientó el trabajo de laboratorio y participé en la discusión de resultados y escritura del artículo.

Principales resultados: La exposición de 2 aislamientos de cianobacterias a dosis de UV-B similares a las que podrían alcanzar el suelo inundado en verano mostró respuestas diferentes. El aislamiento del género *Calothrix* parece presentar un set mas amplio de mecanismos protectores.

Estas publicaciones se citan en este capítulo con la letra romana correspondiente y se adjuntan en el anexo.

#### 4.1. EL ARROZ EN URUGUAY

Uruguay es el principal exportador de arroz de América Latina y ocupa normalmente entre el quinto y octavo lugar a nivel mundial, dependiendo de las áreas de siembra y la variabilidad de los factores climáticos de cada año. El principal destino de la producción de este grano es la exportación (95%). Dentro de los cultivos extensivos, el de arroz es el que invierte más capital por hectárea, no sólo en el costo operativo del cultivo sino también en maquinaria y equipos necesarios para el riego. El cultivo de arroz en Uruguay se basa en general en un sistema de producción en rotaciones con pasturas y cultivos alternativos, integrado con la producción ganadera, buscando asegurar la sustentabilidad productiva, económica y ambiental.

Aproximadamente el 60% de la superficie total del cultivo se siembra en campos que no han tenido arroz en la zafra anterior (“arroz de primer año”), mientras que el 11% del área corresponde a arroz sembrado sobre rastrojo en forma continua durante tres o más años (DIEA, 2010). El arroz ocupa en la rotación un periodo entre 25 – 30% de su duración y el resto del tiempo es ocupado por pasturas naturales regeneradas o siembra de praderas (mezcla de gramíneas y leguminosas). El rendimiento es alto, con un promedio de 8000 kg. ha<sup>-1</sup> (ACA, 2013).

Otras características particulares del cultivo en nuestro país son que se siembra en seco un único cultivo por año y se inunda generalmente entre los 30 - 40 días después de la emergencia. En comparación con otros países productores de arroz, se utiliza baja cantidad y frecuencia de agroquímicos y las cantidades de fertilizante nitrogenado aplicadas (entre 45 - 85 kg. ha<sup>-1</sup> de N) son menores a las usadas en otros sistemas productivos (Deambrosi, 2003). Por ejemplo, en arrozales de Valencia donde la contribución de las cianobacterias a la nutrición nitrogenada de arroz ha sido estudiada, se emplea el doble de la cantidad de fertilizante usado en Uruguay (Fernández Valiente *et al.*, 2000). En China, donde se produce el 30% del arroz del mundo, se usan dosis de 180–240 kg N ha<sup>-1</sup>, con muy baja eficiencia de uso (Peng *et al.*, 2006) que constituye una gran preocupación por sus costos ambientales.

## 4.2. DINÁMICA DEL NITRÓGENO EN UN SUELO INUNDADO

En los arrozales inundados, si bien la disponibilidad de N es mayor que en suelos secos, tiene lugar una secuencia de transformaciones químicas y microbiológicas que es necesario conocer a efectos de optimizar el manejo de los nutrientes. Aunque el aporte de nitrógeno puede condicionar la productividad del arroz, los arrozales inundados tienen una baja eficiencia de recuperación del fertilizante aplicado, entre un 30 y un 40% (Cassman *et al.*, 1998), porque el nitrógeno se pierde por desnitrificación, volatilización de  $\text{NH}_3$  o lixiviación.

Debajo de la lámina de agua de inundación hay una capa fina de suelo de unos 5-10 mm que permanece oxidada por difusión del oxígeno desde el agua. A su vez abajo de la capa oxidada, el suelo está en estado reducido y es allí donde está la mayor parte de las raíces del arroz, hasta la “suela de arada”. En el suelo reducido existe también una capa delgada alrededor de las raíces, oxidada por la excreción radicular de  $\text{O}_2$  proveniente de los tallos vía aerénquima (Dobermann y Fairhurst, 2000).

Las transformaciones que sufrirá el fertilizante nitrogenado en el arrozal dependen de la forma y momento de su aplicación. En Uruguay se usa generalmente una fórmula binaria (NP) en la siembra, como fosfato diamónico, y luego se aplica urea en cobertura en una o dos oportunidades (Gamarra, 1996). Cuando el fertilizante se aplica en cobertura, el N puede perderse como amoníaco por volatilización, o los iones  $\text{NH}_4^+$  pueden difundir en el suelo oxidado y ser absorbidos por la planta directamente o previa nitrificación. El  $\text{NH}_4^+$  también puede ser inmovilizado temporalmente en la materia orgánica del suelo. El  $\text{NO}_3^-$  producto de la nitrificación, puede ser tomado por las raíces o pasar a la zona reducida donde por desnitrificación se pierde como  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{N}_2$ . A su vez, los iones  $\text{NH}_4^+$  que difunden a la capa reducida pueden ser absorbidos por el arroz, adsorberse al complejo de intercambio, o ser inmovilizados.



### **4.3. FBN EN ARROZALES**

Los arrozales inundados son nichos apropiados para la FBN y poseen una variedad de sistemas fijadores de N<sub>2</sub>, heterótrofos o autótrofos, que se encuentran tanto en el suelo, asociados a la planta de arroz, en vida libre o como endófitos (Roger, 1995). La inundación lleva a la diferenciación de varios macro y micro ambientes con distinto potencial redox, estatus lumínico, propiedades físicas y fuentes de nutrientes para la microflora.

#### **4.3.1. Cianobacterias**

Las cianobacterias son importantes productores primarios porque fijan gran cantidad de C haciéndolo biológicamente disponible, especialmente en nichos limitados en nutrientes, desde superficies marinas oligotróficas hasta costras de suelo en desiertos y estructuras hechas por el hombre (García-Pichel *et al.*, 2003). Su nombre tradicional, algas verde-azuladas alude a vida acuática y efectivamente muchas cianobacterias viven sumergidas. Sin embargo, las cianobacterias son muy ubicuas (Whitton y Potts, 2000) y han conquistado hábitats fuera del agua, desde el trópico hasta la Antártida. Además, las cianobacterias son contribuyentes claves a la fijación de nitrógeno global y muchas producen metabolitos secundarios únicos (revisado por Shih *et al.*, 2013). La contribución de cianobacterias del género *Trichodesmium* (sin heterocisto) a la entrada de nutrientes, entre ellos el N, al ecosistema oceánico, se estima en 60-80 Tg de N por año vía FBN (Bergman *et al.*, 2013). Las cianobacterias tienen potencial uso para la producción de biocombustible (Hu *et al.*, 2008) y son conocidas por la capacidad de algunas especies de producir toxinas cuya presencia en agua puede ser potencialmente riesgosa (Codd *et al.*, 2005).

Los estudios taxonómicos organizan las cianobacterias en cinco subsecciones basándose en su complejidad morfológica (Rippka *et al.*, 1979). Los organismos de la subsección IV (Nostocales) y V (Stigonematales) son capaces de diferenciar células específicas para la fijación de nitrógeno, los heterocistos, y formar acinetos, células durmientes, y hormogonios, para la dispersión y competencia simbiótica. La familia Nostocaceae representa una línea filogenética particular que se caracteriza

morfológicamente por presentar: filamentos isopolares, ausencia de ramificaciones, presencia de heterocistos y facultativamente acinetos para- o apo-heterocísticos (Komárek, 2010).

El estado de la sistemática de las cianobacterias es todavía muy complejo. Así, mientras que el sistema de Castenholz (2001) está basado en el código bacteriológico, el de Komárek y Anagnostidis (1999, 2005) sigue la nomenclatura botánica. Komárek (2010) propuso modificar la taxonomía de las cianobacterias teniendo en cuenta los datos moleculares (base genética) en correlación con información bioquímica, ultraestructural, fenotípica y ecológica.

Actualmente se han obtenido las secuencias genómicas completas de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 y de la filamentosa con heterocisto *Anabaena* sp. cepa PCC 7120 (Lüttge, 2011).

#### **4.3.1.1. Diversidad y abundancia de cianobacterias con heterocisto en el arrozal**

El **artículo IV** muestra que de los aislamientos del suelo de un arrozal en el Este de Uruguay, el 90% de las cianobacterias formadoras de heterocistos pertenecían a los géneros *Nostoc* y *Anabaena* y el 10% restante a los géneros *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, y *Gloeotrichia*. Se encontraron además abundantes cianobacterias unicelulares y filamentosas sin heterocistos. La composición de géneros encontrada fue similar a la de otros arrozales de diferentes lugares del mundo, incluso los tropicales (Vaishampayan *et al.*, 2001). Casi todos los años en que se realizaron muestreos (1998-2003), aproximadamente a las 12 semanas después de inundado el cultivo, se observaron afloramientos macroscópicos formados mayoritariamente por cianobacterias del género *Gloeotrichia* y a veces *Anabaena*, que 4 semanas después habían desaparecido. Estas cianobacterias estaban, en general, asociadas físicamente a hojas secas de arroz y malezas (Figura 4.1) y exhibieron en el laboratorio tasas de fijación de nitrógeno muy altas, del orden de  $18 \mu\text{mol de etileno}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso fresco de afloramiento. En arrozales de Valencia (España) se encontró que el 7% de la

superficie de *Chara vulgaris*, la principal macroalga presente, estaba cubierta por microcolonias de cianobacterias diazotrofas (Ariosa *et al.*, 2004).



Figura 4.1. Afloramientos de cianobacterias del género *Gloeotrichia* a las 11 semanas después de la inundación en raíces de plantas acuáticas.

La asignación de los distintos géneros a las cianobacterias con heterocisto se basó en agrupamientos de acuerdo a las características de las colonias observadas con microscopio estereoscópico y características morfológicas observadas con microscopio óptico, según Castehholz (1984). Algunas de esas características morfológicas pueden variar ocasionalmente entre las diferentes cepas y según la etapa del ciclo de vida y otras características fenotípicas, como el color, con las condiciones ambientales. Por esas razones, la aproximación más confiable para la identificación de una determinada cianobacteria debe considerar además atributos fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Prasanna *et al.*, 2006). Esta caracterización polifásica se está llevando a cabo actualmente para la colección de cianobacterias con heterocisto aisladas de arrozales de Treinta y Tres que se conserva liofilizada (Cerecetto, 2014). Para ello se consideran caracteres morfológicos (forma del tricoma, de las células vegetativas, tamaño, posición y tamaño del heterocisto, forma de la célula terminal, presencia de acinetos), y bioquímicos o fisiológicos (actividad nitrogenasa, pigmentos, actividad glutamino sintetasa y nitrato reductasa), además de

moleculares (genes 16S rRNA y *hetR*). De diez aislamientos caracterizados según todos esos parámetros, 7 pertenecían al género *Nostoc* y 3 a *Calothrix*. Entre estos aislamientos estaban los usados en los **artículos V, VII y VIII**. El aislamiento identificado morfológicamente como *Calothrix* tenía un gen con un 95% de similitud con *hetR* de *Calothrix* sp. Los aislamientos identificados morfológicamente como *Nostoc* y *Anabaena* corresponderían de acuerdo al gen del 16S RNA al género *Nostoc* (Cerecetto, 2014).

En el **artículo V** se evaluó la densidad de cianobacterias con heterocistos cultivables presentes en el suelo de un tratamiento control y otro fertilizado con 70 kg de N. ha<sup>-1</sup>, además de la actividad nitrogenasa. Este estudio se realizó durante 3 zafas consecutivas. La abundancia de cianobacterias edáficas mostró un patrón similar todos los años, y los valores máximos se presentaron en el estadio de “embarrigado” (desde el final del primordio al comienzo de la floración) del arroz. El número de cianobacterias con heterocistos fue significativamente menor en el tratamiento fertilizado.

La abundancia de cianobacterias y la actividad nitrogenasa no se correlacionaron. La densidad promedio de cianobacterias con heterocistos en el tratamiento control fue 2,8 x 10<sup>3</sup> UFC. cm<sup>-2</sup> de suelo. Este valor es más bajo que el comunicado para arrozales en España (Fernández-Valiente *et al.*, 2000, Quesada *et al.*, 1997) y menor también que el reportado por el Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI) (Roger y Ladha 1992).

#### **4.3.1.2. Actividad fijadora de N<sub>2</sub> fotodependiente en el arrozal**

La ARA se determinó según Quesada *et al.* (1989) y para ello se emplearon dispositivos como el que se ve en la Figura 4.2.



Figura 4.2. Dispositivo para medir actividad nitrogenasa *in situ*. La cámara de material transparente cuenta en la parte superior con un motor a pila para mover una hélice que facilita la difusión de gases. Un septo de goma permite extraer las muestras de gas en tubos con vacío. (Empleado en **artículos V y VII**)

Los mayores valores de actividad nitrogenasa se encontraron, todos los años, promedialmente 12 semanas después de realizada la inundación. Estos valores permiten estimar que por ciclo de cultivo ingresa al sistema aproximadamente 1 Kg de nitrógeno por hectárea. Este valor tan bajo comparado con los 60 Kg de N que se agregan normalmente como fertilizante químico, probablemente esté subestimando la FBN debido a que los dispositivos se instalaron donde no había afloramientos, de manera que no se consideró la entrada de N consecuencia de la actividad nitrogenasa de éstos y tampoco la de las cianobacterias epífitas. El aporte de nitrógeno por FBN en cultivos de arroz se estima entre 8 y 30 Kg de N. ha<sup>-1</sup> por ciclo de cultivo en España (Quesada et al., 1997). Allí se comprobó que las cianobacterias epífitas sobre *Chara vulgaris* eran los principales contribuyentes a la FBN en arrozales (Ariosa et al., 2004). Respecto a los afloramientos, como no cubren toda la superficie del agua y desaparecen luego de pocos días, es difícil estimar cuánto nitrógeno fijan por hectárea y ciclo de cultivo.

En el **artículo V** no se observaron diferencias entre la actividad fijadora de nitrógeno del tratamiento fertilizado y el control sin nitrógeno, lo que permite

proponer que la fijación de nitrógeno en este arrozal depende de otros factores además de la fertilización. Como el fertilizante se aplicó en una dosis a la siembra y el nitrógeno del suelo vuelve en unos pocos días a la concentración de un suelo sin fertilizar, la fertilización no sería una limitante para la actividad fijadora. Por otra parte, la falta de correlación entre la actividad nitrogenasa y el rendimiento del arroz indicaría que el nitrógeno fijado, considerando la superficie cubierta por la cámara para medir ARA, fue escasamente usado por el cultivo. Como no se observó inhibición de la actividad nitrogenasa por el agregado de fertilizante en condiciones de campo, se realizó un ensayo en laboratorio con aislamientos de *Nostoc* BI42 y *Anabaena* BI46 (**artículo V**) para determinar la concentración de nitrógeno inhibitoria. Los resultados mostraron que con dosis bajas de amonio (0,05mM) había inhibición y a las 24 h de aplicar una concentración 1 mM de amonio, la inhibición fue del 90%. En el arrozal, sólo al momento de aplicar el fertilizante pueden encontrarse concentraciones de amonio similares o mayores a 1mM. Si la fertilización es a la siembra, las cianobacterias pueden estar en formas no vegetativas y de esta forma no se afectaría la FBN.

También se midieron en el laboratorio las actividades fotosintética y nitrogenasa de los mismos aislamientos en presencia de los herbicidas quinclorac y propanil, para evaluar si las dosis recomendadas para el campo afectan la FBN. Solamente el agregado de 1 mg. L<sup>-1</sup> de propanil afectó la fotosíntesis medida como producción de oxígeno, y la actividad nitrogenasa disminuyó más del 40% (**artículo V**). Inderjit y Kaushik (2010) ensayaron el efecto de 3 herbicidas sobre *Anabaena fertilissima* C.B. Rao y también encontraron que el propanil, inhibidor del PS II, afectó severamente a la bacteria a menores dosis. Un ensayo de inoculación de arroz con una cepa mutante de *Anabaena variabilis* [Av (MHR-Eda)r] resistente a varios herbicidas y que excreta amonio, mostró mayor porcentaje de germinación, crecimiento y rendimiento de grano que un control sin inocular (Singh y Datta, 2013).

#### **4.3.2. Recuperación del N del fertilizante**

Los datos disponibles en la literatura indican que el N incorporado por el arroz proviene mayoritariamente de la mineralización de la materia orgánica del suelo y de la fertilización (Cassman et al 1998). Con el fin de evaluar la dinámica de utilización del fertilizante nitrogenado en las condiciones de Uruguay, se aplicó fertilizante enriquecido con  $^{15}\text{N}$  a la siembra y se inoculó con cianobacterias al macollaje junto a la inundación del cultivo (VII) durante dos zafra consecutivas. En la zafra siguiente el fertilizante marcado se aplicó fraccionado, a la siembra, al macollaje y al primordio floral. El empleo de fertilizante enriquecido en  $^{15}\text{N}$  permitió discriminar el N proveniente del fertilizante (Nddf) que era incorporado por la planta o quedaba en el suelo.

La recuperación por la planta del nitrógeno del fertilizante aplicado a la siembra fue del orden del 20%, valor que concuerda con otras determinaciones realizadas en cultivos de arroz bajo inundación (De Datta *et al.*, 1987, Sheehy *et al.*, 2004). Al aplicar 10 kg N. ha<sup>-1</sup> de fertilizante, por lo menos el 98% del N usado por la planta provino del suelo. Cuando la aplicación de N fue fraccionada, la recuperación del N del fertilizante por la planta de arroz fue mayor, del orden del 40% en total, siendo el Nddf mayor cuando se aplicó al macollaje y menor en la aplicación al primordio. La mayor parte del fertilizante fue absorbido previo al estado de primordio floral del arroz. El fraccionamiento de la dosis de fertilizante hizo más efectiva su utilización por el cultivo, o también pudo haber contribuido a disminuir las pérdidas. En este sentido, las pérdidas del N aplicado en arrozales se atribuyen principalmente a nitrificación-desnitrificación acopladas y a la volatilización de  $\text{NH}_3$ . Esta última fuente ha sido reportada como una de las principales causas de pérdida de N en arrozales inundados (Cassman *et al.*, 1998). Sin embargo, Ju *et al.* (2009) encontraron que las pérdidas de N por desnitrificación en alternancia arroz inundado y trigo (secano) eran mayores que por volatilización, aunque la aplicación de urea en cobertura aumentaba estas últimas.

Por otro lado la planta de arroz, dependiendo del cultivar, puede emitir  $\text{NH}_3$  producto de la fotorrespiración cuando la acumulación de N y la asimilación no están balanceadas (Xu *et al.*, 2012).

#### **4.4. INOCULACIÓN DE ARROZ CON CIANOBACTERIAS**

Los primeros ensayos de inoculación de arroz con cianobacterias se realizaron cuando se creía que las cianobacterias formadoras de heterocistos eran escasas en arrozales (Watanabe y Yamamoto, 1971), pero desde hace varios años se conoce su abundancia en suelos cultivados con arroz (Roger, 1995). De todos modos, se han seguido utilizando para inocular cultivos de arroz en varios países aunque con resultados dispares (revisado en **capítulo VI**). En algunos casos se observaron fracasos en la sobrevivencia del inoculante (Reddy *et al.*, 1986), pero también se encontraron aumentos significativos en el rendimiento del arroz inoculado (Yanni, 1996) y esto posiblemente se debe a que la eficacia de la inoculación depende de las condiciones locales. En Egipto, la inoculación de arroz produjo aumentos en el rendimiento de hasta 30% (Yanni y Sehli, 1991), mientras que ensayos en España demostraron que la inoculación permitiría un ahorro de 50% del fertilizante nitrogenado recomendado (Carreres *et al.*, 1996).

La mayoría de la información sobre cianobacterias en arrozales proviene de países donde el cultivo se realiza con inundación permanente y sin rotar con otros cultivos. Hasta hace pocos años se desconocían para Uruguay los datos al respecto, aunque se sabía que el cultivo de arroz utiliza más nitrógeno del que se aporta como fertilizante (Deambrosi *et al.*, 2000) sin disminuir significativamente el contenido de N del suelo.

##### **4.4.1. Inoculación con cianobacterias nativas en Uruguay**

El destino de las cianobacterias en el ecosistema del arrozal depende de su capacidad de crecer, colonizar y sobrevivir en el suelo. La colonización depende de la tasa de



crecimiento y dispersión, mientras que la sobrevivencia depende de la capacidad de sobreponerse a condiciones adversas. Estos factores de los que depende el establecimiento de las cianobacterias inoculadas no se conocen cabalmente, por lo que la mayoría de los ensayos de inoculación son de prueba y error. Roger (1995) propuso, como alternativa a la inoculación, fomentar el crecimiento de las cianobacterias presentes en el suelo.

Los resultados que anteceden, analizados en su conjunto, parecían indicar que la inoculación podría ser una buena alternativa para incrementar el N disponible por la planta en nuestras condiciones al aumentar el número de cianobacterias en estadios del cultivo anteriores a los de mayor requerimiento de nitrógeno y, por lo tanto, permitir que su nitrógeno se mineralizara y fuera aprovechado por la planta. Con ese criterio, en el **artículo VII** se evaluó la contribución de la inoculación con cianobacterias, en asociación con una fuente química de nitrógeno, a la nutrición y el rendimiento del arroz.

La inoculación con cianobacterias aisladas del mismo arrozal no tuvo efecto sobre el rendimiento de arroz al compararlo con un control sin inocular. Tampoco se observaron diferencias en el número de cianobacterias del suelo después de la inoculación sino hasta el final del ciclo del cultivo. El Nddf en la planta no presentó diferencias entre los tratamientos inoculados y no inoculados (**artículo VII**). Sin embargo a la cosecha y en una de las zafas se recuperó más N del fertilizante en los suelos inoculados, lo que podría explicarse por un aumento en la inmovilización de N por los microorganismos.

Por otro lado, se realizó un ensayo en invernáculo (**artículo VII**) en el cual el inóculo consistió en aislamientos de los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Calothrix* crecidos en medio enriquecido con  $^{15}\text{N}$ . A los 25 días después de la inoculación se detectó nitrógeno proveniente de las cianobacterias en las plantas de arroz, con una eficiencia de recuperación por la planta similar a la de aplicar fertilizante químico a la siembra. Un ensayo de laboratorio con suelo incubado a temperatura controlada y sin plantas mostró a partir de las 5 semanas mayor contenido de N mineral en el suelo inoculado que en el sin inocular. Estos resultados indicarían que si bien el

tiempo de mineralización no sería limitante para que el N de las cianobacterias se incorpore a la planta durante el ciclo del cultivo, la mineralización se produce mayoritariamente en una etapa en que el cultivo estaría en un estadio posterior al primordio, cuando los requerimientos de N son menores.

#### **4.5. FOTOSÍNTESIS EN CIANOBACTERIAS**

La mayoría de las cianobacterias absorben la luz principalmente por complejos solubles de pigmentos-proteínas, llamados ficobilisomas, a diferencia de los eucariotas que usan complejos insolubles recolectores de luz asociados a membrana (LHCs), aunque también se han encontrado en cianobacterias una familia de proteínas de unión a la clorofila (CBPs) con función análoga a los LHCs eucariotas. Los ficobilisomas son periféricos en la membrana tilacoidal y difunden en ella.

Como todos los organismos fotoautótrofos, las cianobacterias dependen de la radiación solar como fuente primaria de energía en su ambiente natural. El rendimiento cuántico fotosintético determinado por fluorimetría de pulso de amplitud modulada (PAM) puede proveer información tanto de la fotosíntesis como del estatus de aclimatación (Campbell *et al.*, 1998), pero deben considerarse en su análisis las diferencias de la fotosíntesis cianobacteriana de la vegetal para la que este método fue desarrollado. Debido a que el espectro de fluorescencia de los ficobilisomas se superpone con el de la clorofila (Campbell *et al.*, 1998) y también a que la fotosíntesis comparte transportadores de electrones con la respiración, los valores de  $F_v/F_m$  (fluorescencia variable /fluorescencia máxima) son menores que en eucariotas. Sin embargo el rendimiento cuántico es un parámetro útil para comparar el comportamiento de la misma cianobacteria en distintas condiciones.

Los heterocistos presentan algunos cambios respecto a las células vegetativas, incluidos algunos relacionados con la fotosíntesis. La baja concentración de  $O_2$  necesaria para la actividad nitrogenasa se logra en los heterocistos por las dos capas superpuestas de polisacáridos y glicolípidos que los rodean y porque presentan una alta tasa respiratoria (Zhang *et al.*, 2005). Además, no presentan fotosistema II y

dependen de las células vegetativas para el suministro de C y poder reductor (Meeks y Elhai, 2002).

#### **4.5.1. Cianobacterias y radiación UV**

Diferentes actividades humanas, incluyendo la producción de clorofluorocarburos, han reducido la concentración del ozono estratosférico, lo que resulta en un aumento en el flujo de radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la tierra y las profundidades significantes del océano (Smith *et al.*, 1992). La radiación solar en la parte superior de la atmósfera contiene una cantidad significativa de radiaciones de longitudes de onda corta, y por ende más energética que la luz visible (400-700 nm). Las longitudes de onda en el rango de 100-400 nm constituyen la región ultravioleta del espectro. Las más cortas de estas longitudes de onda, 100-280 nm (UV-C), son completamente bloqueadas (absorbidas) por el oxígeno atmosférico (O<sub>2</sub>) y el ozono (O<sub>3</sub>). Longitudes de onda en el rango de 280-315 nm (UV-B) son absorbidas eficientemente pero no completamente por el O<sub>3</sub>, mientras que longitudes de onda de 315-400 nm (UV-A) son poco absorbidas por el O<sub>3</sub> y son, por lo tanto, más fácilmente transmitidas a la superficie terrestre (Madronich *et al.*, 1998). Excepto por una pequeña porción del UV-A cercano, la radiación UV no es fotosintéticamente activa. Por lo tanto, la radiación UV es algo para tolerar, contrarrestar o evitar en un organismo fotosintético.

Dosis perjudiciales de radiación UV-B y UV-A pueden atravesar la columna de agua y tener efectos perjudiciales sobre los ecosistemas inundados como los arrozales. Debido a que la radiación UV se vuelve progresivamente más perjudicial al disminuir la longitud de onda, el daño potencial a las células aumenta exponencialmente (Castenholz y Garcia-Pichel, 2000). La radiación UV-B de alta energía es la que tiene mayor potencial de daño celular, tanto por sus efectos directos sobre el ADN y las proteínas como por los indirectos, derivados de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Sinha y Häder, 2008). A su vez, cuando la radiación UV-B incide sobre el ADN, puede generar dímeros de pirimidina y otras

mutaciones (Castenholz y Garcia-Pichel, 2000). Los principales procesos bioquímicos y fisiológicos afectados por la radiación UV son la sobrevivencia, pigmentación, producción fotosintética de oxígeno, movilidad, absorción de nitrógeno, composición de las ficobiliproteínas y absorción de CO<sub>2</sub>, que tienen un efecto combinado sobre la sobrevivencia.

La susceptibilidad a la radiación UV está determinada por la compleja interacción entre protección y reparación, que es variable entre diferentes especies de cianobacterias (Zeeshan y Prasad, 2009). Por su distribución cosmopolita se piensa que como grupo, las cianobacterias han sobrevivido a un amplio espectro de estreses. Aunque existían algunos estudios sobre comunidades de cianobacterias de arrozales de India expuestas a radiación UV (Sinha y Häder, 1996), no existía información documentada sobre los efectos de la radiación UV en las cianobacterias aisladas de nuestros arrozales. Por dichos motivos en el **artículo VIII** se evaluó el comportamiento de 2 aislamientos de cianobacterias frente a dosis de UV-B del orden de las que podrían estar expuestas si se usaran como inoculante en el arrozal en verano. La exposición de cianobacterias nativas de los géneros *Anabaena* y *Calothrix* a 1 o 3 h de UV-B afectó la sobrevivencia de ambas bacterias en forma diferencial: sólo en *Anabaena* se observó aumento de la peroxidación lipídica medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que indica indirectamente daño oxidativo por EROs. Por otro lado, en *Calothrix* solo se afectó la actividad fotosintética pero no la actividad nitrogenasa.

#### **4.5.1.1. Efectos sobre la fotosíntesis**

La exposición de las cianobacterias a radiación fotosintéticamente activa (PAR) o UV-A/UV-B elevadas lleva a la fotoinhibición de la fotosíntesis, limitando así el aprovechamiento de la energía lumínica (Shing *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la fotoinhibición del FSII implica la degradación proteolítica de la proteína D1 que, junto con la proteína D2, constituye el centro de reacción P680 (Latifi *et al.*, 2008). En el proceso de recuperación, el precursor de la proteína D1 es sintetizado *de novo* y una vez incorporado al complejo FS II, es procesado para rendir proteína D1 activa

(Shing *et al.*, 2002). La incorporación de la proteína D1 recién sintetizada se ha demostrado en numerosas cepas de cianobacterias y para diferentes estrés ambientales, entre ellos la radiación UV-B (Latifi *et al.*, 2008). El grado de fotoinhibición depende del balance entre la inactivación del complejo FS II y su recuperación desde el estado inactivo (Shing *et al.*, 2002). En nuestro estudio (**artículo VIII**), la máxima eficiencia fotoquímica, medida como Fv/Fm, y la fotoevolución de O<sub>2</sub> fueron más afectadas por la exposición a UV-B en *Calothrix* que en el caso de *Anabaena*, aunque para ambas especies ambos parámetros disminuyeron como era esperable.

#### **4.5.1.2. Producción de EROs**

Tanto la radiación UV-A como UV-B inducen la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) en varios puntos del transporte electrónico respiratorio y fotosintético, así como en diferentes reacciones bioquímicas (Zeeshan y Prasad, 2009). Los fotones altamente energéticos en el rango UV-B son absorbidos por grupos cromofóricos de moléculas biológicamente importantes como clorofilas, ficobiliproteínas y quinonas (Latifi *et al.*, 2008), que pueden actuar como fotosensibilizadores para la producción de EROs (He y Häder, 2002).

Se considera que la mayor producción de EROs es una característica universal frente a las condiciones de estrés general y que sirve para alertar al metabolismo y activar la expresión génica para que ocurran ajustes celulares (He y Häder, 2002). Las EROs actuarían como mensajeros secundarios para regular la transducción de señales, tales como la respuesta de defensa antioxidante y el aumento de la síntesis de proteínas D1 o disminución de la síntesis de la subunidad mayor de la RubisCO (Singh *et al.*, 2002).

El oxígeno singlete y el radical hidroxilo inician la peroxidación lipídica y la producción de peróxidos de lípidos e hidroperóxidos lipídicos que son también altamente reactivos (He y Häder, 2002). Las TBARS permiten estimar el daño de lípidos de membrana, y esta técnica se usó para evaluar la peroxidación lipídica de

estas cianobacterias nativas observándose un aumento solamente en *Anabaena* expuesta a radiación UV-B.

#### **4.5.1.3. Reparación y defensa frente al daño**

Para prevenir los efectos dañinos causados por las EROs, los organismos han desarrollado mecanismos (moléculas antioxidantes y enzimas) para evitar sus consecuencias, que proveen protección capturando esos radicales (Zeeshan y Prasad, 2009). Las moléculas antioxidantes incluyen ascorbato, glutatión reducido, carotenoides, tocoferoles; y las enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa y las enzimas involucradas en el ciclo del ascorbato y glutatión, como la ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato peroxidasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR).

La exposición de la cepa de *Calothrix* sp. BI22 a la radiación UV (**artículo VIII**) indujo aumentos en la actividad SOD, sugiriendo participación de esta enzima como defensa antioxidante. Por otro lado, se analizaron las enzimas CAT y APX, las principales enzimas con actividad de barrido del peróxido de hidrógeno (Tichy y Vermaas, 1999). Para las dos cianobacterias estudiadas la actividad CAT aumentó con exposición de 1 h a UV-B pero disminuyó con 3 h, probablemente por fotodegradación e inactivación de su grupo hemo. En el caso de APX, no se registraron cambios con la exposición a UV-B.

Muchos organismos usan compuestos que absorben radiación UV y representan un mecanismo pasivo de protección (Oren y Gunde-Cimerman, 2007). La radiación UV es, hasta cierto punto, absorbida por dichos protectores sin poder interactuar con sus blancos celulares potenciales. La scitonemina es un pigmento que se ubica en la vaina extracelular de algunas cianobacterias. Este pigmento presenta máximos de absorción en las longitudes de onda UV-A y UV-C, y algo menos en UV-B (Sinha y Häder, 2006). La síntesis de scitonemina es inducida por radiación UV-A principalmente (Flemming y Castenholz, 2007). En el caso de los análisis realizados (**artículo VIII**) no se detectó su presencia en ninguna de las cianobacterias

estudiadas. Si bien este pigmento está ampliamente distribuido en las cianobacterias, se encuentra sobretodo en las capas superiores de los tapetes microbianos formados en ambientes extremos (Balskus *et al.*, 2012) y su síntesis es dependiente de la especie (Fiorda *et al.*, 2011).

Shibata (1969) descubrió que las cianobacterias acumulaban pigmentos incoloros en grandes cantidades. Ahora se sabe que dichos compuestos pertenecen a la familia de los derivados de aminoácidos del tipo de las micosporinas (MAAs), que reducen la radiación dañina que llega a las células (Jiang *et al.*, 2008). Estos compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua, tienen un único máximo de absorción en el rango de radiaciones UV. Los MAAs también pueden servir como moléculas antioxidantes capturando radicales libres del oxígeno, funcionar como solutos compatibles para proteger las células del estrés salino, estar involucrados en la protección contra el estrés térmico o por desecación, así como también servir como reserva intracelular de nitrógeno (Oren y Gunde-Cimerman, 2007). En *Calothrix* sp. BI22 se observó la presencia constitutiva de 2 tipos de MAAs, palitinol y micosporina-2-glicina (**artículo VIII**), aunque no se observó un aumento significativo en la cantidad de MAAs con la exposición a UV-B; ello podría deberse al corto tiempo de exposición o bien a que la dosis fue insuficiente pues se emplearon dosis menores que las referidas en la bibliografía tratando de emular la que alcanza el agua de inundación de un arrozal en verano.

Los resultados del **artículo VIII** permiten concluir que el aislamiento de *Calothrix* posee un conjunto amplio de mecanismos de protección frente al UV-B, por lo que desde este punto de vista sería adecuado para ser usado como biofertilizante en arroz.

#### **4.5.2. Efecto de otros estreses abióticos en cianobacterias**

La colonización por las cianobacterias de océanos, lagos, ríos, aguas termales y suelos, y su presencia como organismos simbióticos de hongos y plantas, requirió una gran capacidad de adaptarse a diversos ambientes. En los hábitats terrestres las cianobacterias están sometidas a una multitud de estreses además de altas intensidades de luz incluyendo la radiación UV, altas y bajas temperaturas incluso

congelamiento, estrés osmótico, salinidad y sequía (Büdel *et al.*, 2008, Potts *et al.*, 2005, Lin *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2002, Allakhverdiev *et al.*, 2000).

Las condiciones de estrés individuales son objeto de abundantes investigaciones. Sin embargo en el campo las cianobacterias están expuestas a una combinación de diferentes tipos de estrés. Estudios recientes en plantas revelan que las respuestas moleculares y metabólicas a una combinación de sequía y calor por ejemplo, no pueden extrapolarse directamente de la respuesta a estos tipos de estrés aplicados individualmente (Mittler, 2006, Lüttge, 2011).

Como las cianobacterias en el arrozal están sometidas a diferentes estreses bióticos y abióticos simultáneamente, se estudió en cómo era afectada la cepa de *Calothrix*, seleccionada por su comportamiento frente a UV-B, cuando se la sometía simultáneamente a estrés osmótico (Doldán, 2012).

#### **4.5.2.1. Estrés osmótico**

La exposición de las células a una elevada osmolaridad resulta en el eflujo de agua del interior, lo que produce la reducción en la presión de turgencia y la contracción del volumen citoplasmático, y como consecuencia, el aumento de la concentración de todos los metabolitos intracelulares, pudiendo inhibir distintos procesos (Csonka, 1989). Los osmolitos compatibles son moléculas orgánicas que en concentraciones altas demuestran compatibilidad con el metabolismo celular y su acumulación se observa frecuentemente en la aclimatación de los organismos a condiciones ambientales adversas (Klähn y Hagemann, 2011).

Fernández *et al.* (1993) observaron la disminución del crecimiento de *Anabaena* sp. L-31 a causa del estrés osmótico impuesto con sacarosa pero sin efecto inhibitorio sobre la actividad nitrogenasa. Allakhverdiev *et al.* (2000) comunicaron que el estrés osmótico debido a sorbitol 1M inactivó la maquinaria de producción de O<sub>2</sub> por el FSII e interrumpió la actividad de transporte del fotosistema I en células de *Synechococcus* intactas.



En trabajos que han supuesto una continuación de los realizados en esta Tesis, Doldán (2012) demostró el efecto negativo sobre la fotosíntesis y la fijación de N<sub>2</sub> de la aplicación de estrés lumínico y osmótico en forma simultánea en *Calothrix* BI22. Con estrés osmótico inducido por PEG 8000 se constató la acumulación de prolina y la peroxidación lipídica, confirmándose daño oxidativo. Se evaluó la respuesta enzimática antioxidante para esos estreses que fue diferente a la obtenida aplicando exclusivamente UV-B.

Estos resultados demuestran que *Calothrix* sp. BI22 es sensible a la combinación de estreses, pero algunas respuestas implican modificaciones fisiológicas que la preparan para preservarse ante otra situación estresante. Esta plasticidad fenotípica que mejoraría su capacidad de adaptación merece seguir estudiándose. Si bien los trabajos de laboratorio en condiciones controladas, permiten aislar la respuesta bacteriana frente a los efectos de distintos factores de estrés, se debe ser cauteloso con la extrapolación de estos datos a las condiciones de campo. En ese ambiente, las bacterias están expuestas a más de un factor de estrés, tanto abióticos (luz PAR y distintos tipos de UV, estrés osmótico, desecación, etc.), como bióticos de naturaleza amplia.

## **5. EMISIONES DE N<sub>2</sub>O EN AGROECOSISTEMAS DE URUGUAY**

Este capítulo trata sobre las emisiones de N<sub>2</sub>O en el cultivo de arroz y en distintas secuencias de cultivos bajo diferentes laboreos de suelo. Comprende 3 artículos publicados, uno enviado y un capítulo de libro, en los que figuran los primeros datos obtenidos en Uruguay sobre la magnitud de estas emisiones por la agricultura.

El objetivo fue obtener datos nacionales sobre emisión de gases de efecto invernadero diferentes al CO<sub>2</sub> en suelos agrícolas. Estos datos son necesarios para evaluar herramientas eficaces de mitigación de las emisiones para nuestros sistemas agrícolas y para un cálculo más ajustado de la huella de C de los productos agropecuarios de exportación.

En forma preliminar, se estudió la emisión de N<sub>2</sub>O por pasturas, campo natural, así como el efecto sobre la emisión del laboreo y distintas rotaciones. En el cultivo de arroz, se ensayó el efecto de una cobertura invernal y la fertilización y diferentes manejos del riego, sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O. La hipótesis general fue que alguna de las prácticas evaluadas podría mitigar las emisiones.

Las preguntas que se intentaron responder fueron:

¿Son comparables las magnitudes de los flujos de N<sub>2</sub>O de cultivos agrícolas y pasturas con los provenientes de campo natural?

¿Cómo afectan las emisiones de N<sub>2</sub>O la rotación o no de cultivos y la siembra directa?

¿Cuál es el efecto sobre los procesos involucrados en la emisión de N<sub>2</sub>O del empleo de un fertilizante con un inhibidor de la nitrificación en el cultivo de arroz?

¿Cuál es el potencial de calentamiento global del cultivo de arroz en las condiciones de Uruguay? ¿Es afectado por la fertilización y el uso previo del suelo?

¿Pueden mitigarse las emisiones de gases de efecto invernadero en el cultivo de arroz mediante el manejo del riego sin afectar el rendimiento?

Publicaciones anexadas y contribución a las mismas:

- IX.** Tarlera S, Gonnet S, Irisarri P, Menes J, Fernández A, Paolino G, Travers D. 2006. Nitrification and denitrification associated with N<sub>2</sub>O production in a temperate N-fertilized irrigated Uruguayan ricefield. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology. Exploiting Microbes and Their Interactions*. Wiley-VHC, Weinheim ed. 416-420.

Participé en la redacción del proyecto, medición de emisiones de N<sub>2</sub>O y redacción del capítulo.

Principales resultados: Menos del 7% de la emisión de N<sub>2</sub>O era debida a la nitrificación cuando se empleaba un fertilizante nitrogenado con el inhibidor de la nitrificación DMPP en el cultivo de arroz. De muestras de suelo de ese tratamiento no se amplificaron genes de la amonio monooxigenasa.

- X.** Dominguez V, Irisarri P, Gonnet S. 2007. Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación. *Agrociencia* 11: 50-57.

Participé en la redacción del proyecto, orienté y participé en parte en el trabajo experimental, análisis y discusión de datos y en la escritura del artículo.

Principales resultados: El empleo de un fertilizante comercial con DMPP disminuyó la cantidad de nitrato del suelo y la emisión de N<sub>2</sub>O hasta 30 días después de aplicado. Después de la inundación el N<sub>2</sub>O provenía de la desnitrificación.

- XI.** Perdomo C, Irisarri P, Ernst O. 2009. Nitrous oxide emissions from an Uruguayan argiudoll under different tillage and rotation treatments. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 84: 119-128.

Participé en la medición de las emisiones por cromatografía gaseosa, discusión de resultados y escritura del artículo.

Principales resultados: Estas primeras mediciones de los flujos de N<sub>2</sub>O en suelos agrícolas de Uruguay mostraron un patrón anual irregular que fue mayor en primavera y otoño y con picos asociados a lluvias y temperaturas altas. Los picos de

emisión tendieron a ser mayores bajo agricultura o pasturas sembradas que en campo natural y no se observaron efectos consistentes del laboreo o la rotación.

- XII.** Irisarri P, Pereyra V, Fernández A, Terra J, Tarlera S. 2012. Emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en un arrozal: primeras medidas en el sistema productivo uruguayo. *Agrociencia* 16: 1-10.

Participé en la redacción del proyecto, el trabajo de campo y laboratorio, análisis de datos y escritura del artículo.

Principales resultados: La primera aproximación a la emisión de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en un arrozal del país comprobó que ambos gases tienen un patrón de emisión opuesto, mientras que las mayores emisiones de CH<sub>4</sub> coincidieron con la etapa reproductiva del arroz, las de N<sub>2</sub>O se produjeron en la fase vegetativa con picos luego de los baños. Los mayores flujos de CH<sub>4</sub> se detectaron en el tratamiento fertilizado que había tenido una cobertura previa de raigrás.

- XIII.** Capurro MC, Tarlera S, Irisarri P, Fernández A, Cantou G, Roel A. 2014. Yield-scaled global warming potential of two irrigation managements in a highly productive rice system in Uruguay. Enviado a *Paddy and Water Environment*. (Los 3 primeros autores contribuyeron por igual al trabajo).

Participé en las mediciones de las emisiones de N<sub>2</sub>O, cálculos y análisis de datos, discusión y escritura del artículo.

Principales resultados: Se comparó el potencial de calentamiento global del riego convencional y un sistema de déficit de riego controlado que emitió un 55% menos de CH<sub>4</sub>. El riego alternativo no aumentó la emisión de N<sub>2</sub>O pero redujo el rendimiento en una de las zafras evaluadas.

Estas publicaciones se citan en este capítulo con la letra romana correspondiente y se ajustan en el anexo.

En este capítulo se resume parte de la revisión publicada en el libro “Emisiones de metano y óxido nitroso: principales gases de efecto invernadero producidos por el

sector agropecuario en Uruguay” del que soy autora junto a C. Perdomo y cuya publicación fue financiada por CSIC-UdelaR (2009) y actualizaciones a partir de la misma.

### **5.1. GASES DE EFECTO INVERNADERO Y AGRICULTURA**

Los principales gases con efecto invernadero (GEI) presentes en la atmósfera son el vapor de agua, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>), el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y los halocarburos. Estos gases absorben parte de la radiación infrarroja reflejada por la superficie terrestre y la re-emiten en todas direcciones, lo que provoca el calentamiento de la superficie terrestre y de las capas bajas de la atmósfera. Sin este "efecto invernadero" natural, las temperaturas en la Tierra serían mucho menores que las actuales (alrededor de 33° C más bajas) y la vida tal como la conocemos no sería posible. Sin embargo, existe preocupación internacional debido al creciente aumento en la concentración de GEI por la actividad humana, lo cual provoca un "efecto invernadero aumentado". El incremento adicional de temperatura asociado podría producir un cambio climático global perdurable, ya que los GEI poseen una larga vida media en la atmósfera (Tabla 5.1). Sin embargo existen muchas incertidumbres acerca de la magnitud de los cambios de GEI y de sus balances globales (Bowden *et al.*, 2000), lo que justifica la investigación sobre sus fuentes y sumideros.

Las emisiones mundiales de GEI como consecuencia de actividades humanas han aumentado desde la era preindustrial, pero el mayor incremento (70%) se ha registrado entre 1970 y 2004 (IPCC, 2007). La mayor parte de las emisiones totales de GEI corresponden a CO<sub>2</sub> que proviene del empleo de combustible fósil, mientras que sólo el 20% de este gas proviene del suelo. Lo contrario sucede con las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O que provienen mayormente de la agricultura, por lo cual las actividades agrícolas contribuirían en alrededor de un 30% al aumento en el calentamiento global (Mosier *et al.*, 1998). Las estimaciones realizadas en Uruguay indican que debido al incremento del área forestada la emisión neta de CO<sub>2</sub> sería negativa, y que las mayores emisiones de GEI corresponderían a CH<sub>4</sub> y a N<sub>2</sub>O, respectivamente. 14.446 y 9.697 Mton de equivalentes de CO<sub>2</sub> en 100 años

(DINAMA, 2006). De esta forma, el sector agrícola juega un rol importante tanto por su potencial de captura de CO<sub>2</sub>, como de emisión de otros gases.

Tabla 5.1. Concentración, tiempo de residencia, incremento anual y contribución al calentamiento global del CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O (IPCC, 2007).

<b>Gases</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>4</sub></b>	<b>N<sub>2</sub>O</b>
Concentración actual (ppbv)	379000	1732	319
Concentración pre-inudtrial (ppbv)	280000	715	270
Tasa de crecimiento (ppbv año <sup>-1</sup> )	1600	8	0.8
Tiempo de residencia	variable <sup>a</sup>	12,2	166
Aumento de fuerza de radiación (W m <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	1,56	0,47	0,1
PCG <sup>c</sup> en 20 años	1	56	280
PCG <sup>c</sup> en 100 años	1	21	310

<sup>a</sup> La forma en que el CO<sub>2</sub> es absorbido por los océanos y la biosfera todavía no está clara.

<sup>b</sup> Estimación del aumento de la fuerza de radiación debido al cambio de concentración desde los tiempos pre-industriales al presente.

<sup>c</sup> Potencial de calentamiento global, es la fuerza de radiación acumulativa en un horizonte de tiempo determinado causada por unidad de masa del gas emitido, expresada en forma relativa respecto al CO<sub>2</sub>.

Los principales procesos responsables de las emisiones de GEI en agroecosistemas se esquematizan en la Figura 5.1. Los flujos de CO<sub>2</sub> entre la atmósfera y los ecosistemas terrestres están controlados mayoritariamente por el consumo fotosintético y la liberación vía descomposición y combustión de la materia orgánica. Todos estos procesos pueden ser modificados por el hombre y en los últimos siglos se han liberado cantidades sustanciales de CO<sub>2</sub> como consecuencia de la tala de bosques. En los ecosistemas terrestres el carbono es absorbido tanto por la vegetación como por los suelos, aunque en los ecosistemas no forestados la cantidad almacenada en los suelos es actualmente mucho mayor que la presente en la vegetación (IPCC, 2007). El manejo del suelo puede modificar la cantidad de carbono que se emite como CO<sub>2</sub>, ya que el laboreo produce un microambiente favorable para acelerar la descomposición microbiana de los restos animales y vegetales (Kessavalou *et al.*, 1998).

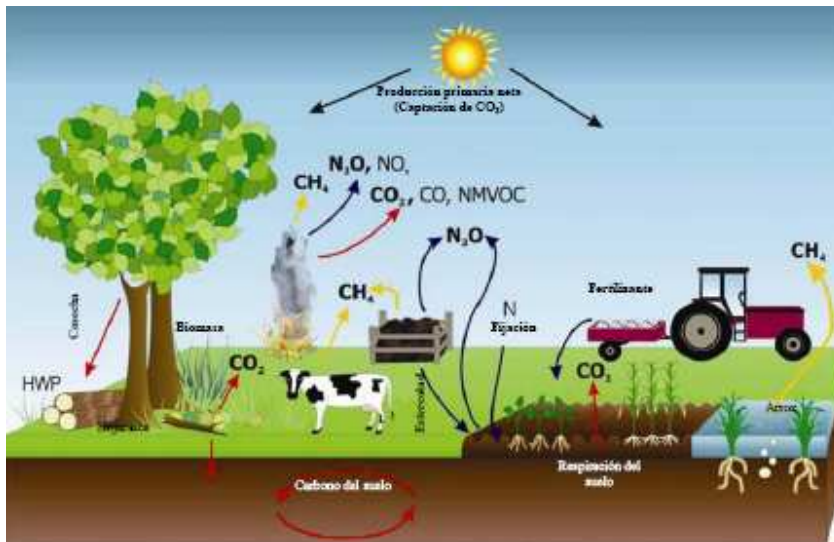


Figura 5.1. Principales procesos emisores y consumidores de GEI en agroecosistemas (IPCC, 2006).

### 5.1.1. Metano

El  $\text{CH}_4$  es el compuesto orgánico gaseoso más abundante en la atmósfera y el segundo en abundancia entre los GEI (Tabla 5.1). Aunque su concentración atmosférica es mucho menor que la de  $\text{CO}_2$ , el  $\text{CH}_4$  absorbe la radiación terrestre en la región del espectro con longitudes de onda de 4 a 10  $\mu\text{m}$  (IR) en forma más efectiva que el  $\text{CO}_2$ . Se estima que el  $\text{CH}_4$ , mol a mol, contribuye unas 21 veces más que el  $\text{CO}_2$  al cambio climático, aunque su vida media en la atmósfera es más corta (unos 12 años). En los últimos 300 años la concentración de  $\text{CH}_4$  atmosférico ha aumentado de 0,35 a 1,8 ppm (IPCC, 2013).

#### 5.1.1.1. Fuentes de metano

Las liberación total de  $\text{CH}_4$  a la atmósfera se ha estimado en 600 Tg. año<sup>-1</sup>. Los suelos naturalmente inundados (humedales) son considerados la principal fuente natural de este gas. Se estima que las actividades agrícolas contribuyen en un 65% a las emisiones totales de  $\text{CH}_4$  antropogénico (Chan y Parkin, 2001). Los cultivos inundados son normalmente productores netos de  $\text{CH}_4$ , siendo responsables del 12% de la emisión mundial anual (IPCC, 2007). En estos sistemas se estima que la

producción de CH<sub>4</sub> es de unos 575 Tg año<sup>-1</sup>, pero que sólo 100 Tg año<sup>-1</sup> escapan a la atmósfera, ya que el resto se oxidaría en la superficie del suelo. Según Jacobson (2005), el cultivo de arroz constituye la principal fuente antropogénica de emisión global de CH<sub>4</sub>. Los sistemas agrícolas no inundados normalmente son consumidores, aunque pueden ser productores o consumidores netos dependiendo del uso de la tierra y las condiciones climáticas (Goulding *et al.*, 1996).

En el caso de Uruguay se estima que del total de CH<sub>4</sub> emitido el 90% proviene del sector agropecuario, correspondiendo el 84% a la fermentación ruminal del ganado, un 2% al manejo del estiércol y sólo un 4% al generado por cultivos como el arroz (DINAMA, 2010), aunque todas estas estimaciones se han realizado con factores por defecto del IPCC.

#### **5.1.1.2. Sumideros de metano**

Alrededor del 90% del CH<sub>4</sub> anual emitido es oxidado en la tropósfera y estratósfera por reacciones fotoquímicas iniciadas por los radicales OH. Una cantidad menor, pero significativa se consume por oxidación biológica en los suelos (unas 30 Tg. año<sup>-1</sup>), valor que es casi de la misma magnitud que el del aumento anual neto de CH<sub>4</sub> atmosférico (Crutzen y Lelieveld, 2001). Este proceso se da por acción de bacterias metanótrofas que son aerobias y abundantes en los suelos (Mancinelli, 1995). Estos microorganismos oxidan el CH<sub>4</sub>, utilizándolo como fuente de C y energía produciendo biomasa y CO<sub>2</sub> en varias etapas y con distintas enzimas.

#### **5.1.2. Óxido nitroso**

El óxido nitroso, el tercero en abundancia de los GEI antropogénicos, atrapa la radiación infraroja 298 veces más efectivamente que el CO<sub>2</sub> y persiste en la atmósfera por unos 118 años. La concentración atmosférica de N<sub>2</sub>O es de 319 ppb y está aumentando a una tasa de 0,26 % por año (Bates *et al.*, 2008). Además de sus propiedades “invernadero”, está involucrado en la disminución del ozono estratosférico. Si bien el N<sub>2</sub>O es poco reactivo en la tropósfera, su oxidación con una pequeña fracción de estado excitado O\*(<sup>1</sup>D) producido por la fotólisis del ozono, es



la principal fuente estratosférica de NO que cataliza la destrucción del ozono. Como el N<sub>2</sub>O se produce mayoritariamente por la actividad microbiológica en aguas y suelos, incluyendo las actividades agrícolas, la biosfera puede tener una influencia importante sobre la capa de ozono estratosférica (Crutzen y Lelieveld, 2001).

#### **5.1.2.1. Fuentes de N<sub>2</sub>O**

Los suelos agrícolas se consideran la mayor fuente de N<sub>2</sub>O (65-70% de lo emitido por la biosfera) y NO. A nivel global la principal fuente antropogénica de N<sub>2</sub>O son los suelos cultivados, que lo producen a una tasa de 1,7-4,8 Tg N año<sup>-1</sup> (IPCC, 2007) y otras fuentes menores son la combustión de biomasa, la industria química y el ganado. En Uruguay se estima que el 99% de las emisiones de este gas provienen del sector agropecuario, y a su vez el 90% de éstas proviene de las excreciones de animales en pastoreo (DINAMA, 2010).

El aumento de la disponibilidad de N inorgánico en el suelo trae aparejado un aumento de las emisiones de N<sub>2</sub>O. A su vez, las fuentes de N<sub>2</sub>O en el suelo son variadas e incluyen el N del suelo, el proveniente de la deposición atmosférica reciente, el aportado con la fertilización y con los residuos de la cosecha y el presente en acuíferos subterráneos. La fijación biológica de nitrógeno no se considera una fuente directa de N<sub>2</sub>O, ya que no hay evidencias de emisiones significativas provenientes de este proceso (Rochette y Janzen, 2005). El aumento en la emisión de N<sub>2</sub>O se asocia principalmente con el creciente agregado de fertilizantes nitrogenados y con el aumento de la mineralización de N orgánico en ecosistemas agrícolas, resultado de cambios en el manejo o en el uso de la tierra.

## **5.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS GEI**

La cuantificación de las emisiones de GEI por la agricultura es fundamental para identificar estrategias de mitigación, orientar planes de desarrollo nacionales con bajas emisiones, generar y comercializar créditos de carbono, certificar prácticas de agricultura sostenible, informar a los consumidores sobre la huella de C de los

productos y fomentar prácticas menos intensivas en liberación de CO<sub>2</sub> equivalentes por parte de los productores (Olander *et al.*, 2013).

Los flujos de N<sub>2</sub>O del suelo pueden medirse usando técnicas micrometeorológicas (Wagner-Riddle *et al.*, 1997), perfiles de suelo (Rolston, 1986), o cámaras estáticas. Las cámaras son las más usadas para comparar flujos entre tratamientos pero también para calcular los factores de emisión en los inventarios de GEI (IPCC, 2006), ya que su costo relativo es bajo, son portátiles y fáciles de operar (Butterbach-Bahl *et al.*, 2013; Denmead, 2008). A su vez, se adaptan a un amplio rango de ecosistemas y diseños experimentales (Rochette, 2011). El principio básico de las cámaras estáticas es tomar un determinado número de muestras de gas en un período de tiempo (tres en nuestro caso) desde el espacio vacío de la cámara hermética que encierra la superficie del suelo, incluyendo la planta en el caso del arroz. Los flujos de los GEI se calculan a partir del cambio en las concentraciones en el espacio vacío de la cámara a lo largo del tiempo.

Rochette y Eriksen-Hamel (2008) revisaron las principales características de las cámaras y de la toma de muestras que son necesarias para evitar cometer errores en las determinaciones de los flujos de gases. Las cámaras empleadas en nuestros trabajos (**publicaciones IX, X, XI, XII y XIII**) cumplen en general los requisitos detallados en esa revisión.

### **5.2.1. Manejo del suelo y emisiones de N<sub>2</sub>O**

El área agrícola se ha expandido rápidamente en Uruguay en los últimos 10 años (DIEA, 2012) y más del 90% se siembra actualmente sin laboreo y cada vez más como agricultura continua, sin rotación con pasturas. Los cambios en el uso del suelo pueden influir en la magnitud de las emisiones de GEI, pero la dirección de estos cambios no siempre puede anticiparse. Por lo tanto, es necesario obtener información local para mejorar las estimaciones de los flujos de gases emitidos en diferentes situaciones productivas. Con ese fin se comparó la magnitud de las emisiones de N<sub>2</sub>O de un ensayo de rotaciones de largo plazo de la EEMAC (Paysandú) durante la etapa de cultivos y el efecto del laboreo (**artículo XI**, Fig 5.2).

Los flujos de  $N_2O$  variaron ampliamente entre fechas, registrándose los mayores flujos en general después de lluvias y/o en períodos de temperatura del suelo alta (**artículo XI**). La ausencia de relaciones simples entre la emisión de  $N_2O$  y las características del suelo refleja probablemente la complejidad inherente al metabolismo microbiano del  $N_2O$ , el contraste entre los factores ambientales que regulan su producción y consumo, y el alto grado de variabilidad espacial y temporal de las emisiones. Según Conrad (1996) el metabolismo de los gases traza ocurre dentro de micrositios del suelo, y la actividad microbiana puede ser muy heterogénea dentro de los mismos, dependiendo de la disponibilidad de sustratos.

El contenido de agua del suelo regula la concentración de oxígeno presente en el mismo. En suelos bien aireados pero húmedos, con valores de espacio poroso del suelo ocupado por agua (WFPS) de 40-60%, las emisiones como resultado de la nitrificación de amonio pueden ser importantes, mientras que en suelos con aireación restringida (WFPS mayor a 80%), la emisión de  $N_2O$  proviene generalmente de la desnitrificación (Mosier, 1998). Pero aún en condiciones de suelo aeróbico la reducción de  $NO_3^-$  puede ser el principal mecanismo productor de  $N_2O$  (Müller *et al.*, 2004), lo que ocurre debido a la existencia de agregados de suelo (micrositios) ricos en materia orgánica fácilmente degradable. En estos micrositios pueden coexistir procesos de nitrificación y de desnitrificación, debido a que las altas tasas de consumo de  $O_2$  producen anaerobiosis en su centro mientras que los bordes de los agregados permanecen en estado aeróbico. La estructura del suelo y el C disponible también pueden afectar la relación  $N_2O/N_2$  emitida, debido a que cuanto más compactado esté el suelo y más C lábil esté disponible mayor será el grado de anaerobiosis, y predominará el  $N_2$ . El tipo de organismo desnitrificante presente también va a afectar esta relación, ya que las distintas poblaciones bacterianas poseen enzimas con diferente sensibilidad al  $O_2$  e incluso hay bacterias que desnitrifican aun bajo condiciones aeróbicas (Conrad, 1996).

Los suelos permanentemente saturados de agua son probablemente fuentes menos importantes de  $N_2O$  que los saturados en forma intermitente. Esto ocurre porque la nitrificación está restringida en condiciones permanentemente anaeróbicas. Por otra

parte, los organismos desnitrificantes de suelos bien drenados no están adaptados a episodios de anaerobiosis, por lo que su potencial de producción de  $N_2O$  es alto cuando se inunda y el potencial de consumo de  $N_2O$  y de producción de  $N_2$  es inicialmente bajo. En general, tanto la nitrificación como la desnitrificación emiten  $N_2O$  cuando las condiciones no son las óptimas para cada proceso.

También los microorganismos tienen una temperatura óptima, por lo que los flujos altos de  $N_2O$  sólo ocurren cuando la humedad y la temperatura no son limitantes (Dobbie *et al.*, 1999). La lluvia y la temperatura controlan además de la velocidad de nitrificación y desnitrificación, la mineralización de C y N, el consumo de N por las plantas y la difusión de gases en los suelos; y todos estos regulan el flujo de  $N_2O$  (Williams *et al.*, 1999).

Por otra parte en nuestro trabajo, el evento con mayor flujo de  $N_2O$  ( $99 \text{ g N ha d}^{-1}$ ) ocurrió en el período de barbecho (**artículo IX**). Esto coincide con lo observado por otros autores que han sugerido que minimizar el barbecho puede ser una forma de disminuir la emisión de  $N_2O$  (Mosier *et al.*, 2003).

El incremento de las emisiones de  $N_2O$  por los suelos agrícolas se ha relacionado con el aumento de las aplicaciones de N (Mosier *et al.*, 1996). En cultivos, luego de la fertilización las emisiones normalmente aumentan por un período relativamente corto (unas 6 semanas) y luego vuelven al nivel inicial (Mosier, 1998). Pero el nivel de emisión basal no depende únicamente de los agregados recientes de N al suelo, sino que está más relacionado al nivel de materia orgánica del suelo y a la tasa de mineralización de la misma (Peterson *et al.*, 2006). En nuestro ensayo, la aplicación de fertilizante al cultivo de cebada no produjo un incremento del flujo de  $N_2O$  (**artículo XI**). Esto se debió probablemente a la alta eficiencia de uso del fertilizante aplicado fraccionado en los estadios de la planta de activo crecimiento, y que por lo tanto no dejaban N en el suelo susceptible de perderse.



Figura 5.2. Campanas en las que se tomaron las muestras gaseosas para determinar el flujo de  $N_2O$  por cromatografía de gases (**artículo XI**) a) pradera, b) campo natural, c) laboreo continuo y d) siembra directa.

Las prácticas de manejo del suelo a través de su efecto sobre la materia orgánica del suelo (MOS), humedad, porosidad y temperatura, pueden influir indirectamente en la formación y liberación de  $N_2O$  por el suelo. Se ha comunicado que hay mayores pérdidas de gases con N ( $N_2O + N_2$ ) en trigo sin laboreo que bajo laboreo convencional (Jacinthe y Dick, 1997) y se atribuyó estos resultados a la mayor densidad aparente y contenido de agua de los suelos no laboreados. Estos autores observaron sin embargo, que durante el barbecho las pérdidas gaseosas eran 7 veces mayores en los suelos laboreados que en los no laboreados. También encontraron para distintos cultivos que las emisiones de  $N_2O$  eran mayores en la entrefila que en la fila. Heincke y Kaupenjohann (1999) citan que en suelos compactados por tractores, las concentraciones de  $N_2O$  en el aire del suelo fueron significativamente mayores que en los controles. De todas maneras, el tipo de laboreo no tiene un efecto único, ya que las interacciones complejas que gobiernan los procesos de

concentración de N<sub>2</sub>O en suelos pueden afectar en diferentes direcciones. Por un lado, la arada puede aumentar la permeabilidad del suelo, lo que disminuye la concentración de N<sub>2</sub>O y por otro lado la MO enterrada con la arada puede aumentar la producción de N<sub>2</sub>O, pues posiciona la capa de suelo más rica en materia orgánica en una zona más anaeróbica.

En nuestro ensayo se evaluaron durante un año las emisiones procedentes de laboreo convencional y siembra directa, cada uno a su vez bajo dos secuencias de cultivos (cultivos agrícolas continuos o cultivos en rotaciones con pasturas), no se observaron diferencias de flujo de N<sub>2</sub>O consistentes (**artículo XI**). Estudios con distintos laboreos realizados en el Sur de Brasil obtuvieron resultados similares (Jantalia *et al.*, 2008). Estos resultados no son inesperados, ya que como sostienen Venterea *et al.* (2005) no pueden generalizarse las ventajas o desventajas de la reducción del laboreo para mitigar las emisiones de GEI, ya que las mismas dependerían de la región, del agroecosistema particular y de otros factores como los momentos de aplicación del fertilizante.

De acuerdo a lo esperado, en este ensayo nacional las emisiones de N<sub>2</sub>O procedentes de cultivos o pasturas fueron significativamente mayores que las provenientes de suelo bajo campo natural, mezcla de pastos C3 y C4 (Fig 3.2). Por otra parte, las magnitudes emitidas por estos sistemas se correspondieron razonablemente bien con las estimaciones del IPCC (**artículo XI**).

### **5.2.2. Emisiones de GEI en el cultivo de arroz**

En su revisión de datos de diferentes partes del mundo, Linqvist *et al.* (2012) concluyeron que entre los cereales, el potencial de calentamiento global (PCG) es significativamente mayor para el arroz que para trigo o maíz. En este cultivo, el CH<sub>4</sub> es el principal GEI producido y emitido (Hadi *et al.*, 2010) y está controlado por el agua, el fertilizante y el manejo de los restos orgánicos (Linqvist *et al.*, 2012, Yan *et al.*, 2005). El CH<sub>4</sub> se produce en el suelo inundado a partir de la degradación anaerobia de la materia orgánica por la flora metanogénica. La exudación de compuestos orgánicos desde la planta y la descomposición de las raíces forman una

parte importante de los sustratos utilizados por la microflora para generar este gas (Van Bodegom *et al.*, 2001). Por otra parte, los sistemas arroceros emiten  $N_2O$ , y en general hay una relación inversa entre las emisiones de  $CH_4$  y las de  $N_2O$  (Hou *et al.*, 2000). También el cultivo de arroz es diferente a otros, puesto que en este cultivo la mayoría de los GEI se emiten a través de la planta más que desde el suelo (Yu *et al.*, 1997). En los cultivos anegados, el intercambio de gases entre el aire y las partes sumergidas se realiza a través del aerénquima, un tejido especializado que permite tanto la entrada como el escape de gases, y sería la principal vía de emisión de  $CH_4$  (Le Mer y Roger, 2001). El oxígeno que llega a las raíces difunde por éstas hacia el suelo, generando un microambiente que permite el desarrollo de una flora aerobia. En esta interfase óxica-anóxica, están presentes tanto el  $CH_4$  producido en las zonas anaerobias como el oxígeno que necesitan las bacterias metanótrofas para metabolizar el  $CH_4$  a  $CO_2$  (Watanabe *et al.*, 1997). La emisión de  $CH_4$  por el cultivo de arroz es por tanto el resultado del balance entre la producción por las bacterias metanogénicas y la oxidación por las bacterias metanótrofas (Macalady *et al.*, 2002).

Entre los factores que afectan las emisiones de  $CH_4$  en el arroz se encuentran la variedad de arroz y las medidas de manejo que modifican el potencial redox del suelo y su contenido de N (Towprayoon *et al.*, 2005, Smith, 1999). Parece existir correlación positiva entre la biomasa radicular de la variedad de arroz y la emisión de  $CH_4$ , pero no se ha encontrado correlación entre la masa de exudados radiculares y la emisión (Kerdchoechuen, 2005).

La relación entre el ciclo de N y el nivel de N mineral del suelo con el consumo de  $CH_4$  es compleja. Muchos estudios muestran reducciones en el consumo de  $CH_4$  como consecuencia de la fertilización nitrogenada (Hütsch, 1998, Boeckx *et al.*, 1997, Willison *et al.*, 1995, King, 1994). En cambio, otros trabajos proponen que la fertilización nitrogenada puede incrementar el consumo de  $CH_4$ , ya que a niveles bajos de N mineral en el suelo, el amonio puede ser usado como fuente de N por los metanótrofos (Bodelier *et al.*, 2000, Castro *et al.*, 1995). En la rizósfera la cantidad de N puede ser baja si la planta lo consume, por lo que la comunidad metanótrofa podría estar en condiciones limitantes de N para su crecimiento. Como consecuencia

del agregado de N, se estimularía el crecimiento y la actividad metanótrofa en mayor grado que inhibiría la enzima MMO (metano monooxigenasa) por el  $\text{NO}_2^-$  o el uso de  $\text{NH}_2\text{OH}$  como sustrato alternativo. Por otro lado, los fertilizantes nitrogenados en el cultivo de arroz podrían estimular el desarrollo de la planta, aumentando la exudación de compuestos orgánicos por sus raíces. Los exudados radicales a su vez provocarían el aumento de la actividad de las bacterias metanogénicas. Se ha sugerido también que la velocidad de recambio de N (mineralización y nitrificación) influyen sobre el consumo de  $\text{CH}_4$  más que el contenido de N mineral del suelo (Mosier *et al.*, 1991), observándose una relación inversa entre la tasa de nitrificación y la oxidación de  $\text{CH}_4$  en suelos templados (Hütsch, 2001). Sin embargo, otros autores no han encontrado una relación entre el consumo de  $\text{CH}_4$  y la tasa de mineralización, cuando paralelamente existe un retiro continuo de amonio por el crecimiento activo de las plantas (Bowden *et al.*, 2000). Estos autores afirman que si bien los incrementos transitorios de  $\text{NH}_4^+$  en el suelo provocados por la fertilización nitrogenada normalmente causan fuertes reducciones en el consumo de  $\text{CH}_4$ , esto no implica que este consumo se reduzca en suelos con gran recambio de N. Contrariamente a la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  el agregado de  $\text{NO}_3^-$  no inhibe la oxidación de  $\text{CH}_4$  (Hütsch, 2001), salvo a concentraciones tan altas que aumenten los efectos osmóticos (Bodelier y Laanbroek, 2004). Debido a lo intrincado de estas relaciones, el estudio de las bacterias metanótrofas así como el del papel que juega el nitrógeno mineral sobre estos microorganismos y sus procesos metabólicos debe profundizarse.

En las primeras medidas de emisión de GEI realizadas en Uruguay en el cultivo de arroz (**artículos IX, X, XII y XIII**) no se detectaron emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de 15 días de establecida la inundación, las mayores emisiones fueron en la etapa vegetativa del cultivo cuando el suelo está seco pero relacionadas a los baños o inundación. El principal GEI emitido fue el  $\text{CH}_4$  y su patrón fue contrario al de  $\text{N}_2\text{O}$  con la mayor tasa correspondiendo con la etapa reproductiva del cultivo. Diferentes autores (Neue, 1997, Schütz *et al.*, 1989) han comunicado que alrededor de un 90% del  $\text{CH}_4$  producido durante todo el ciclo del cultivo se emite en la floración, etapa de máximo incremento de la biomasa. El arroz sembrado sobre una cobertura de raigrás



y fertilizado con nitrógeno emitió más del doble de CH<sub>4</sub> que el sembrado sobre suelo desnudo (**artículo XII**). Los diferentes agregados orgánicos estimulan el flujo de CH<sub>4</sub> al aumentar el suministro de C para los metanógenos (Wassmann *et al.*, 2000, Yagi *et al.*, 1996), especialmente en el caso del raigrás que presenta alta relación C/N.

En sistemas arroceros se recomienda drenar el campo alguna vez durante la estación de crecimiento para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> (Jain *et al.*, 2013, Tyagi *et al.*, 2010, Minamikawa y Sakai 2006). Pero el drenaje puede aumentar las emisiones de N<sub>2</sub>O (Hou *et al.*, 2000) y por lo tanto no disminuir el PCG. Sin embargo, el PCG en la mayoría de los estudios es menor en arrozales drenados que en los inundados continuamente (Itoh *et al.*, 2011). Tres años consecutivos de mediciones de las emisiones en un ensayo con riego controlado, donde se mantenía el suelo húmedo aunque sin inundar entre macollaje y primordio (RC), mostraron que el CH<sub>4</sub> emitido se redujo sustancialmente, alrededor del 60% (**artículo XIII**). Esta reducción se debió a que el tratamiento con alternancia de humedad y secado del suelo (RC) presentó picos de flujo de CH<sub>4</sub> significativamente menores, a la vez que un período de emisión más corto, que cuando se inundaba continuamente a partir de 30 días de emergido el arroz (IC30). El N<sub>2</sub>O tendió a aumentar en el tratamiento RC aunque las diferencias no fueron significativas y su flujo no se correlacionó con los momentos de aplicación de fertilizante nitrogenado. Como el CH<sub>4</sub> representa más del 90% de los equivalentes CO<sub>2</sub> totales, el PCG disminuyó en un 50% con el tratamiento RC. El control del riego, en uno de los años estudiados, produjo disminución en el rendimiento en grano. Si bien aún considerando los equivalentes CO<sub>2</sub> por kg de arroz producido el PCG se redujo en un 50% con el RC, esto se debió a una disminución importante en las emisiones de CH<sub>4</sub> y no a aumentos en el rendimiento. A pesar de existir muchos estudios sobre la disminución del PCG del cultivo de arroz con drenaje intermitente o riego controlado, estos se han efectuado en sistemas que permanecen anaeróbicos durante todo el cultivo. Nuestros resultados en un sistema de cultivo donde la inundación se produce recién 30 días después de la emergencia del arroz confirman los obtenidos en otras condiciones. Además refuerzan la

importancia de conocer el efecto de las estrategias de mitigación de las emisiones sobre el rendimiento para que sean adoptadas por los productores.

### **5.2.3. Inhibidores de la nitrificación**

La nitrificación es el principal proceso del ciclo del N que lleva directamente a pérdidas de este elemento (Subbarao *et al.* 2009). El empleo de inhibidores de la nitrificación se ha recomendado para disminuir el flujo de N<sub>2</sub>O, y para aumentar la capacidad de retención de N por el suelo se ha propuesto agregarlo a los fertilizantes. Estos compuestos enlentecen la oxidación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por un cierto período y entre los inhibidores químicos se encuentran la diacindiamida y la nitrapirina (Subbarao *et al.*, 2006, Weiske *et al.*, 2001). En los **artículos IX y X** se empleó un fertilizante comercial que contenía 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) como inhibidor de la nitrificación que había sido reportado como mejorador del rendimiento de varios cultivos, entre ellos el arroz (Pasda *et al.*, 2001). Si bien las concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el suelo fueron menores en el tratamiento con fertilizante que contenía DMPP, entre las 3-4 semanas de su aplicación, lapso en el que se observaron los mayores picos de N<sub>2</sub>O, no hubo diferencias entre tratamientos en los flujos de N<sub>2</sub>O totales y éstos no pudieron correlacionarse con el contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del suelo (**X**). Algunos estudios muestran que el efecto inhibitor debería prolongarse por 6-8 semanas después de aplicado el fertilizante para ser efectivo en la reducción del N<sub>2</sub>O emitido (Thorman *et al.*, 2007).

Para estimar el aporte de la nitrificación y la desnitrificación a las emisiones de N<sub>2</sub>O, se emplearon diferentes concentraciones de acetileno para inhibir la nitrificación y el pasaje de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub> por desnitrificación (Merino *et al.* 2001). Se observó que la nitrificación contribuyó en menor medida a la emisión de N<sub>2</sub>O en el tratamiento con fertilizante con DMPP que en el fertilizado con urea. Este ensayo se realizó en invernáculo y durante el período de suelo no inundado el mismo se mantuvo a 60% de capacidad de campo. En macollaje y con el cultivo ya inundado la desnitrificación también fue menor para ese tratamiento (**artículo IX**). Cuando se estudió el potencial nitrificante y desnitrificante del suelo proveniente de un ensayo

de campo, sólo se observaron diferencias en cuanto al potencial nitrificante entre los tratamientos con fertilizante con DMPP y el tratamiento con urea, presentando el primero mayor actividad (**artículo X**). Estos resultados contradictorios pueden ser consecuencia de las condiciones de humedad del suelo, teniendo en cuenta además que no se está considerando la nitrificación heterótrofa. Por otra parte se estudió la diversidad de la población nitrificante en suelo antes de inundar por T-RFLP, encontrándose picos correspondientes a *Nitrosomonas* y *Nitrosospira* (**artículo IX**). Cuando se realizó ese trabajo se desconocía la presencia de arqueas oxidadoras de amonio (AOA). Actualmente se está realizando en nuestro laboratorio un estudio de abundancia y diversidad de poblaciones de AOB y AOA en suelos cultivados con arroz bajo distintos tratamientos y a lo largo del ciclo de cultivo (Azzíz *et al.*, 2013).

La capacidad de ciertas especies vegetales de liberar por sus raíces moléculas orgánicas que inhiben específicamente la función de las bacterias nitrificantes en el suelo se conoce como “inhibición biológica de la nitrificación” (BNI, del inglés) (Subbarao *et al.*, 2009). Para detectar una potencial inhibición de la nitrificación en exudados radicales se usa un ensayo de bioluminescencia con una cepa de *Nitrosomonas europaea* recombinante (Subbarao *et al.*, 2006, Iizumi *et al.*, 1998). Esta cepa recombinante lleva los genes *luxAB* y produce un patrón característico de luminescencia que se correlaciona con la producción de nitrito (Subbarao *et al.*, 2006). Mediante este ensayo se demostró gran capacidad BNI en *Brachiaria* spp pero con diferencias interespecíficas (Subbarao *et al.*, 2007). Entre los cereales evaluados en ese experimento sólo el sorgo mostró capacidad BNI importante, aunque en arroz, Pariasca Tanaka *et al.* (2010) encontraron gran variabilidad entre las distintas variedades evaluadas. En un ensayo realizado en nuestro laboratorio comparando un cultivar de arroz de origen japónica con otro de origen índica se encontró en ambos capacidad BNI aunque baja (Illarze *et al.*, 2013).

Recientemente, entre las prácticas recomendadas para mitigar las emisiones de N<sub>2</sub>O Ussiri y Lal (2013) proponen como la más importante mejorar la eficiencia de uso del fertilizante nitrogenado, mediante predicciones más ajustadas del N requerido, su

ubicación en el suelo y momento adecuado de aplicación, atendiendo a sincronizar las aplicaciones con las demandas de la planta a lo largo del ciclo del cultivo.

## **6. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Un uso sostenible del N en los agrosistemas pasa por aumentar el ingreso de este elemento y evitar sus pérdidas. En ese sentido, los trabajos incluidos en esta tesis constituyen una contribución a la explotación de la FBN y el mejoramiento de la eficiencia de uso del fertilizante, que permitirían manejar a los microorganismos del suelo a los efectos de maximizar la productividad y minimizar los impactos ambientales.

### **6.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LOTUS**

Las pasturas permanentes en Uruguay son en su mayoría mezclas de leguminosas y gramíneas, en las que la especie leguminosa más relevante es *L. corniculatus*. Los distintos Lotus establecen simbiosis con rizobios específicos. Si bien Uruguay tiene una larga historia de inoculación de leguminosas con rizobios, hay una demanda de parte de los productores de inoculantes con comportamientos en el campo más consistentes.

Las metodologías usadas para la identificación de cepas de rizobio previo al desarrollo de técnicas moleculares presentan diferentes limitaciones. En base a ellas, pero también con la secuenciación del gen 16S rRNA, pudieron identificarse los tipos distintos de rizobios que nodulan *L. subbiflorus* y *L. corniculatus*. Los bradirizobios presentaron los genes de todas las reductasas responsables de la desnitrificación y capacidad desnitrificante, si bien solo en *B. japonicum* y *A. caulinodans* se ha demostrado capacidad de reducir  $\text{NO}_3^-$  simultáneamente a  $\text{NH}_4^+$  y a  $\text{N}_2$  creciendo en ausencia de oxígeno con  $\text{NO}_3^-$  (Delgado *et al.*, 2007). Nuestro trabajo fue el primero en estudiar la presencia de estos genes en rizobios que nodulan Lotus.

Debido a la expansión del área agrícola en Uruguay, las pasturas están siendo relegadas a áreas marginales (Ayala *et al.*, 2007). En estos suelos de menor fertilidad y después de un período de sequía prolongada en el norte del país, se exploró la

variación genotípica y fenotípica de los rizobios que nodulaban *L. corniculatus*. Se obtuvo información taxonómica y fisiológica detallada de las poblaciones de rizobios nativas en dos zonas distintas del país. Por primera vez se caracterizó a nivel molecular la cepa usada como inoculante comercial en Uruguay para esta especie de Lotus. Como la simbiosis se considera más sensible a los estreses ambientales que sus componentes individuales (Werner, 1992) se esperaba que la población de rizobios se viera afectada. De esta colección de rizobios de 2 regiones del país que tenían diferencias en el agua disponible en el suelo e historia de inoculación, podrán seleccionarse mejores inoculantes (Lindström *et al.*, 2010) para responder a las restricciones ambientales de las nuevas áreas a que ha sido desplazada la ganadería y que compitan mejor por la ocupación de los nódulos con los rizobios del suelo.

Entre las conclusiones a las que hemos podido arribar se señala :

La caracterización de rizobios nativos/naturalizados que nodulan eficientemente *L. subbiflorus* y *L. pedunculatus* permitió establecer que pertenecen al género *Bradyrhizobium* y no son eficientes en *L. corniculatus* y *L. tenuis*. Entre los aislamientos caracterizados se evaluó la cepa nativa que actualmente se usa como inoculante de *L. subbiflorus*.

Se logró evaluar la capacidad desnitrificante de rizobios y bradirizobios nativos que nodulan *Lotus* sp., comprobándose que sólo los bradirizobios son capaces de desnitrificar en condiciones microaeróbicas. Los bradirizobios presentan secuencias génicas homólogas a las que codifican las subunidades de las enzimas reductasas desnitrificantes en *B. japonicum*, mientras que los rizobios solo presentan homología con el gen *nirK*.

Se dispone de una colección de aislamientos de rizobios de nódulos de *L. corniculatus* provenientes de distintos lugares del país. Estos aislamientos presentan una alta diversidad que puede ser la base para la selección de inoculantes. Los aislamientos pueden distinguirse por sus perfiles ERIC, facilitando su identificación en ensayos de competencia, por ejemplo.

La mayoría de los aislamientos de *L. corniculatus* y el inoculante comercial (caracterizado genéticamente por primera vez) se agrupan según sus genes 16SrRNA, *atpD* y regiones ITS con *M. huakuii* y no con la cepa tipo de *M. loti*. Sin embargo, estas cepas poseen genes simbióticos similares a *M. loti*, lo que sugiere que la transferencia horizontal de genes sería importante entre los *Mesorhizobium* en las condiciones de los suelos de Uruguay.

El perfil ERIC del inoculante comercial para *L. corniculatus* que se usa desde hace 40 años en Uruguay fue diferente al del resto de los aislamientos. Esto indica que sufrió rearrreglos génicos posteriores a su liberación en el suelo, o bien que no es suficientemente competitivo respecto a los mesorizobios nativos, alguno de los cuales ha dominado la nodulación en años posteriores. Esto pone de manifiesto la necesidad de seguir estudiando la competitividad de los rizobios nativos y permite disponer de una herramienta adecuada para realizar esos estudios.

Para continuar con el estudio de la fijación de nitrógeno en forrajeras sería interesante conocer el comportamiento de los rizobios nativos en cuanto a su competencia por la nodulación en distintos suelos con o sin historia previa de inoculación. La competencia por la nodulación de una cepa de rizobio frente a rizobios ineficientes presentes en el suelo, es una característica particularmente interesante de evaluar. Los resultados de los ensayos de competencia son importantes para considerar que rizobios usar como inoculantes y tendrían un impacto directo en el sector productivo. Este tema es de particular interés en tréboles, donde rizobios ineficientes podrían ocupar rápidamente los nódulos.

Por otro lado, la senescencia y descomposición de los nódulos en el suelo, asociada a la presencia de genes desnitrificantes en los rizobios, es un campo de investigación interesante, desde el que se podría hacer aportes importantes a la comprensión del ciclo de N en praderas.

## 6.2. FIJACIÓN BIOLÓGICA POR CIANOBACTERIAS EN ARROZ

El cultivo de arroz en condiciones de inundación constituye un ambiente favorable para el crecimiento de cianobacterias (Roger, 1995). Se conocía desde hace muchos años la contribución de cianobacterias a la fertilidad de arrozales tropicales (Watanabe, 1986). Sin embargo, en Uruguay donde el arroz es un importante producto de exportación, el aporte de la FBN en arrozales no había sido estudiado. Con los trabajos presentados en esta tesis se constató en principio que las cianobacterias sobrevivían en secano y su población cultivable era diversa. La densidad poblacional era menor a la reportada en otras partes con métodos similares (Fernández Valiente *et al.*, 2000). La estimación de la FBN, con todos los inconvenientes de la reducción de acetileno *in situ* (Roger y Ladha, 1992), resultó en niveles bajos de aporte al cultivo que no eran afectados por la fertilización. Esta cantidad de N<sub>2</sub> fijada está subestimada porque fue medida entre filas y donde no había afloramientos, ya que estos eran esporádicos. Se evaluaron algunos factores que podían afectar la fijación o incluso la sobrevivencia de las cianobacterias, como el agregado de una fuente de N mineral y dos herbicidas que se usan en arrozales. Se dedujo entonces que la bioaumentación con cianobacterias aisladas del arrozal mediante inoculación podía disminuir el tiempo necesario para colonizar el suelo eficientemente. Para eso se usaron algunos aislamientos nativos de la colección obtenida del campo y se fabricó un inoculante experimental. Para ver cuál era el aporte de la inoculación a la nutrición nitrogenada del arroz se usó fertilizante enriquecido en <sup>15</sup>N. No se pudo detectar ninguna diferencia en el N derivado del fertilizante en la planta respecto al tratamiento no inoculado y la inoculación tampoco aumentó la densidad poblacional de las cianobacterias hasta el final del ciclo. En un intento de estudiar qué factores podían estar afectando la sobrevivencia y desarrollo de las cianobacterias, se estudió a nivel metabólico como afectaba a alguno de los aislamientos la luz UV-B que puede alcanzar en verano el suelo en estas latitudes. La respuesta de distintos aislamientos difirió indicando que puede seleccionarse alguno con mejores respuestas a los estreses que tendrá que soportar en



el campo. Además del aporte de nitrógeno se han reportado otros beneficios de el uso de biofertilizantes en base a cianobacterias, que incluyen mejora en la estructura del suelo, movilización de fosfatos, liberación de O<sub>2</sub>, entre otros (Altieri, 2002). Por esas razones, sigue siendo relevante estudiar los factores que afectan su crecimiento y considerarlas al pensar en cultivos orgánicos.

Las conclusiones más importantes fueron:

La mayor parte (90%) de las cianobacterias con heterocistos aisladas de un suelo de arrozal en Uruguay pertenece a los géneros *Nostoc* y *Anabaena*. Afloramientos esporádicos de *Gloeotrichia* sp. se observaron por lo menos después de 2 meses de inundado el cultivo.

El recuento de cianobacterias con heterocistos, del orden de 10<sup>3</sup>, fue menor que el reportado para arrozales tropicales y disminuyó con la fertilización nitrogenada.

La mayor actividad nitrogenasa *in situ* se registró en la etapa de llenado de grano (al final del ciclo de cultivo) y no disminuyó con la fertilización.

El agregado de las dosis recomendadas de quinclorac y propanil, herbicidas usados en el cultivo de arroz, no disminuyó la actividad nitrogenasa, aunque dosis mayores de propanil podrían provocar la disminución de esa actividad.

La inoculación de arroz con cianobacterias con heterocistos del propio arrozal en el momento de inundación, no modificó la recuperación del N del fertilizante por la planta ni el rendimiento del cultivo de arroz.

La eficiencia de uso del N por el arroz fue de 20% cuando todo el fertilizante se agregó a la siembra y se duplicó cuando se aplicó fraccionado, con la mayor absorción al macollaje.

La mineralización de las cianobacterias en un ensayo en invernáculo permitió detectar N fijado en la planta 25 días después de inoculadas, lo que da idea de la velocidad de este proceso. El aumento del N inorgánico en el suelo asociado a la inoculación ocurrió después de las etapas más demandantes de N del cultivo.

El comportamiento de 2 cianobacterias aisladas de arrozales frente a la radiación UV-B fue diferente. El aislamiento de *Calothrix* mostró mayor sobrevivencia frente a

la exposición a UV-B y una síntesis constitutiva de aminoácidos de tipo micosporina que actuarían como fotoprotectores. Por otra parte, la radiación UV-B produjo descenso de la actividad nitrogenasa en *Anabaena* pero no en *Calothrix*. El nivel de peroxidación lipídica que indica daño oxidativo solo aumentó en *Anabaena*. En el caso de *Calothrix* la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa aumentó con el tiempo de exposición a UV-B. Todos estos resultados identifican este aislamiento como mejor candidato para ser usado como biofertilizante respecto a la radiación UV-B

De acuerdo a estos primeros estudios de las cianobacterias con heterocistos en un arrozal uruguayo, se puede concluir que es necesario conocer los factores que están limitando su presencia y desarrollo, así como su aporte en la FBN. Con estos conocimientos se podría optimizar su manejo y aumentar el aporte de N que realizan al cultivo de arroz. A esos efectos, es importante disponer de una colección de cianobacterias con heterocistos identificadas. Por otra parte resulta muy interesante el empleo de cianobacterias con heterocistos que produzcan una cápsula de exopolisacáridos, ya que éstos son formadores de biofilms donde se adhieren y se nutren otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal, constituyendo un verdadero consorcio microbiano.

### **6.3. EMISIÓN DE N<sub>2</sub>O**

#### **6.3.1. Rotaciones y laboreo**

La metodología del IPCC para elaborar los inventarios nacionales de N<sub>2</sub>O provenientes de la agricultura (IPCC, 2006) asumen un factor del 1% del N agregado al suelo. Este factor no tiene en cuenta el clima, manejo, suelos, tipos de cultivo. Por otra parte hay reportes contradictorios respecto al efecto de la siembra directa (Passianoto *et al.*, 2003, Robertson *et al.*, 2000), cada vez mas empleada en Uruguay. En nuestro caso no detectamos diferencias consistentes entre la emisión de N<sub>2</sub>O de la siembra directa respecto al laboreo convencional.

Como conclusiones:

Se obtuvieron los primeros datos locales de emisiones de N<sub>2</sub>O en un experimento de largo plazo en rotaciones y diferentes laboreos del suelo ubicado en Paysandú. El patrón de emisión de N<sub>2</sub>O se presentó irregular, si bien los mayores picos correspondieron a situaciones de alta temperatura y lluvia o después de una acumulación de nitrato en el suelo, aunque no se pudieron establecer correlaciones.

Las emisiones fueron mayores en períodos de primavera-verano y en los diferentes tratamientos, con o sin laboreo y rotaciones respecto a agricultura continua, en relación a las determinaciones en el campo natural. Los efectos de las rotaciones y el laboreo no fueron consistentes a lo largo del año. El agregado de fertilizante a los cultivos no aumentó la emisión de N<sub>2</sub>O probablemente debido a la alta eficiencia de su empleo por el cultivo.

### **6.3.2. Cultivo de arroz**

El cultivo en Uruguay tiene características particulares, se planta en general con rotación con pasturas, emplea una cantidad baja de fertilizante nitrogenado del orden de 70 kg N ha<sup>-1</sup> y tiene un rendimiento muy alto (Blanco *et al.*, 2010). Se diseñaron unas cámaras estáticas que permitieran incluir la planta de arroz en las mediciones de gases (Lindau *et al.* 1991).

La emisión de N<sub>2</sub>O en estas condiciones se produce mayoritariamente en la fase en secano del cultivo pero asociada a los baños y hasta unas 3 semanas después de la inundación. La nitrificación es el principal proceso del ciclo del N que lleva directamente a pérdidas de este elemento (Subbarao *et al.* 2009). El empleo de inhibidores de la desnitrificación se ha recomendado para reducir la emisión de N<sub>2</sub>O (Pasda *et al.*, 2001). En nuestro caso no pudimos detectar disminución de la emisión, probablemente debido a la gran variabilidad de la misma, que ha sido reportada (Zhao *et al.* 2011). La emisión de CH<sub>4</sub>, el principal GEI emitido por el arroz, comienza después de la inundación con la anaerobiosis y alcanza su pico en la etapa de floración. En esa etapa el aerénquima de la planta está desarrollado y los exudados

radicales son mayores aportando sustratos carbonados para las arqueas metanogénicas (Towprayoon *et al.* 2000).

La mayor parte del arroz en el mundo se planta en condiciones permanentemente anaeróbicas por eso existe muy poca información con respecto a las emisiones de GEI en sistemas como el uruguayo con 30 días iniciales en aerobiosis. van Groenigen *et al.* (2010) propusieron evaluar las emisiones de GEI derivadas de la agricultura dividiendo las emisiones acumuladas durante el ciclo del cultivo por el rendimiento, de forma de tener un valor de la eficiencia agrícola. En un ensayo de 3 años de evaluación de un sistema con déficit controlado de riego para mitigar las emisiones se redujo en un 45% el potencial de calentamiento global por kg de arroz producido,

Principales conclusiones:

El empleo de un fertilizante con DMPP como inhibidor de la nitrificación condujo a una menor concentración de nitrato en el suelo y menor emisión de  $N_2O$  hasta los 30 días después de la siembra. Sin embargo, las emisiones de  $N_2O$  acumuladas no fueron afectadas.

Se pudo determinar que después de la inundación y a la cosecha todo el  $N_2O$  provino de la desnitrificación, mientras que tanto nitrificación como desnitrificación fueron fuentes de  $N_2O$  cuando el cultivo no estaba inundado.

Entre los gases emitidos por el cultivo de arroz, el  $CH_4$  fue el principal GEI emitido, y su patrón de emisión tuvo un comportamiento opuesto al del  $N_2O$  a lo largo del ciclo del cultivo. Las mayores emisiones de  $CH_4$  coincidieron con la etapa reproductiva del arroz, mientras que en el caso del  $N_2O$  se produjeron en la fase vegetativa, de acuerdo al potencial redox del suelo y el aporte de los exudados radicales.

Manejos del cultivo de arroz: La siembra de arroz sobre una cobertura de raigrás y fertilizado con nitrógeno se asoció a la emisión de más del doble de  $CH_4$  que en el caso de la siembra sobre suelo desnudo, confirmando la importancia de evaluar todo el sistema y no solo la etapa en que el suelo está ocupado por el arroz.

El control del déficit de agua entre el macollaje y la aparición del primordio floral con respecto a la inundación a los 30 días de la emergencia del arroz, disminuyó la emisión de  $\text{CH}_4$  sin aumentar la de  $\text{N}_2\text{O}$ . Al considerar el rendimiento, el déficit controlado de agua reduce el potencial de calentamiento global por kg de arroz producido en un 45%. Sin embargo, el rendimiento disminuyó en alguno de los años evaluados con el control del riego y esto debe tenerse en cuenta al recomendar un manejo del agua diferente a los productores.

#### Perspectivas:

A los efectos de mejorar la comprensión de la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  asociada al cultivo de arroz, debe considerarse todo el sistema productivo y no solamente la etapa en que el suelo está ocupado por arroz. Para ese estudio, es necesario considerar las diferentes alternativas de intensificación de uso del suelo que manejan los productores que podrían llegar a una agricultura continua. Además, es preciso entender cómo los cambios en el tamaño o en la diversidad de la comunidad microbiana aumentan o reducen las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  en respuesta a las condiciones ambientales o prácticas agrícolas. El conocimiento de su relación con los flujos de  $\text{N}_2\text{O}$  resulta de suma importancia para comprender la velocidad y control de estos procesos y por lo tanto poder establecer prácticas de manejo para mitigar las emisiones. La producción de inhibidores de la nitrificación por las plantas, particularmente las del tipo C4, se presenta como una estrategia interesante para controlar el ciclo del N en el suelo y por lo tanto evitar algunas pérdidas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz). 2013. Guía de buenas prácticas agrícolas [En línea]. Disponible en: <http://www.aca.com.uy/manual-de-buenas-practicas-agricolas>. Consultado el 31 de Agosto de 2013.
- Alexandre A, Laranjo M, Oliveira S. 2006. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microbial Ecology* 51: 128-136.
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Murata N. 2000. Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*. Contribution of water channels. *Plant Physiology* 122: 1201–1208.
- Altier N, Beyhaut E, Pérez C. 2013. Root nodule and rhizosphere bacteria for forage legume growth promotion and disease management. En: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A. (Eds.). *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 167-184.
- Altieri MA. 2002. Agroecology: The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 1-24.
- Ampomah OY, Huss-Danell K. 2011. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Systematic and Applied Microbiology* 34:267-275.
- Ariosa Y, Quesada A, Aburto J, Carrasco D, Carreres R, Leganés F, Fernández Valiente E. 2004. Epiphytic cyanobacteria on *Chara vulgaris* are the main contributors to N<sub>2</sub> fixation in rice fields. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9): 5391–5397.
- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB, Puhler A. 1988. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology* 203: 715–385.

- Arp DJ, Stein LY. 2003. Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38(6): 471-495.
- Ayala W, Bermúdez R, Barrios E. 2007. Efecto de la carga animal en la performance de corderos cruza Texel pastoreando *Lotus corniculatus* durante el verano. En: Resultados preliminares en cultivos y forrajeras de verano. Resultados Experimentales 2006-2007. INIA Serie de Actividades de Difusión No. 499. 29-34.
- Azzíz G, Trasante T, Monza J, Altier N, Irisarri P. 2013. Amplificación, clonación y secuenciación de genes funcionales de microorganismos nitrificantes y desnitrificantes en suelos de arrozal. En: X Encuentro Nacional de Microbiólogos. Montevideo. p. 30.
- Balskus EP, Case RJ, Walsh CT. 2012. The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mats communities. *FEMS Microbiology Ecology* 77(2): 322-332.
- Baraibar A, Frioni L, Guedes ME, Ljunggreen H. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34(6): 1011-1017.
- Bates B, Kundzewicz Z, Wu S, Palutikof J. 2008. En: *Climate Change and Water*, IPCC Technical Paper VI. [En línea]. Disponible en: [www.ipcc.ch/pdf/technical-papers/climate-change-water-en.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/technical-papers/climate-change-water-en.pdf). Consultado el 15 de mayo de 2014.
- Batista L. 2013. Prospección y caracterización de rizobios para el desarrollo de inoculantes para trébol y lotus. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, Uruguay. 140 p.
- Batista L, Tomasco I, Lorite MJ, Sanjuán J, Monza J. 2012. Diversity and phylogeny of rhizobial strains isolated from *Lotus uliginosus* grown in Uruguayan soils. *Applied Soil Ecology* 66: 19-28.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems*. Malde, Blackwell Science. 759 p.

- Bergman B, Sandh G, Lin S, Larsson J, Carpenter EJ. 2013. *Trichodesmium* – a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. FEMS Microbiology Reviews 37(3): 286-302.
- Black M, Moolhuijzen P, Chapman B, Barrero R, Howieson J, Hungria M, Bellgard M. 2012. The genetics of symbiotic nitrogen fixation: Comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. Genes 3: 138-166.
- Blanco P, Roel A, Deambrosi E, Bonilla C, Cantou G, Molina F. 2010. Closing the yield gap in rice production in Uruguay: impact of technological changes. <http://ricecongress.com/previous/extPdfs/OP02-4335-Blanco-edited.pdf>. Consultado el 24 Febrero 2014
- Bodelier PL, Laanbroek HJ. 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. FEMS Microbiology Ecology 47: 265-277.
- Bodelier PL, Rselev P, Henckel T, Frenzel P. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soils around rice roots. Nature 403: 421-424.
- Boeckx P, van Cleemput O, Villaralvo I. 1997. Methane oxidation in soils with different textures and land use. Nutrient Cycling in Agroecosystems 49: 91-95.
- Bonaldi, K, Gourion B, Fardoux J, Hannibal L, Cartieaux F, Boursot M, Vallenet D, Chaintreuil C, Prin Y, Nouwen N *et al.* 2010. Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with *Aeschynomene indica*. Molecular Plant Microbe Interactions 23: 760–770.
- Bowden RD, Rullo G, Stevens GR, Steudler PA. 2000. Soil fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide, and methane at a productive temperate deciduous forest. Journal of Environmental Quality 29: 268-276.
- Boyd ES, Hamilton TL, Peters JW. 2011. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. Frontiers in Microbiology 2: 205.
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. 2000. Keys to symbiotic harmony. Journal of Bacteriology 182: 5641–5652.



- Büdel B, Bendix J, Bicker FR, Green TGA. 2008. Dewfall as a water source frequently activates the endolithic cyanobacterial communities in the granites of Taylor valley, Antarctica. *Journal of Phycology* 44: 1415–1424.
- Butterbach-Bahl K, Baggs EM, Dannenmann M, Kiese R, Zechmeister-Boltenstern S. 2013. Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls? *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* 368: 20130122.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Romero E. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26: 111-121.
- Camargo D. 2012. Desarrollo de un inoculante rizobiano para un nuevo cultivar de *Lotus uliginosus*. Tesis de Maestría en Biotecnología, Montevideo, Facultad de Ciencias, 93 p.
- Campbell D, Hurry V, Clarke A K, Gustafsson P, Öquist G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 667–683.
- Canfield DE, Glazer PN, Palkowsky AG. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* 330: 192-196.
- Carámbula M. 2003. Pasturas y forrajes. Potenciales y alternativas para producir forraje. Buenos Aires: Hemisferio Sur. 357 p.
- Carámbula M, Ayala W, Carriquiry E. 1994. *Lotus pedunculatus*, Adelantos de una forrajera que promete. INIA Treinta y Tres. Serie Técnica 45. 13 pp.
- Cardoso JD, Hungria M, Andrade DS. 2012. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Applied Microbiology & Biotechnology* 93(5): 2035-2049.
- Carreres R, Gonzalez-Tomé R, Sendra J, Ballesteros R, Fernández-Valiente E, Quesada A, Nieva M, Leganés F. 1996. Effect of nitrogen rates on rice growth and biological nitrogen fixation. *Journal of Agricultural Science* 127: 295-302.

- Casella JP, Shapleigh A, Toffanin M, Basaglia. 2006. Investigation into the role of the truncated denitrification chain in *R. sultae* strain HCNT1. *Biochemical Society Transactions* 34(1): 130–132.
- Cassman K, Peng S, Olk DC, Ladha JK, Reichardt W, Dobermann A, Singh U. 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crop Research* 56: 7-39.
- Castenholz RW. 2001. General characteristics of the cyanobacteria. En: Boone DR, Castenholz RW. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da ed. New York: New York Springer-Verlag. 474-487.
- Castenholz RW, Garcia-Pichel F. 2000. Cyanobacterial responses to UV-radiation. En: Whitton B A, Potts M. (Eds.). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. 591-611.
- Castenholz RW. 1984. Subsection III. Order Oscillatoriales. Subsection IV. Order Nostocales. En: Holt-Baltimore JG. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams y Wilkins.
- Castro IV, Ferreira EM, McGrath SP. 2003. Survival and plasmid stability of rhizobia introduced into a contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35(1): 49-54.
- Castro MS, Steudler PA, Mellilo JM, Aber JD, Bowden RD. 1995. Factors controlling atmospheric methane consumption by temperate forest soils. *Global Biogeochemical Cycles* 9: 1-10.
- Cerecetto V. 2014. Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR. 67 pp.
- Chan ASK, Parkin TB. 2001. Effect of land use on methane flux from soil. *Journal of Environmental Quality* 30:786-797.
- Chapuis-Lardy L, Wrage N, Metay A, Chotte JL, Bernoux M. 2007. Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. *Global change biology* 13: 1-17.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. 2005. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology Applied Pharmacology* 203: 264–272.

- Cole JA, Brown CM. 1980. Nitrite reduction to ammonium by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters* 7: 65-72.
- Conrad R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O and NO). *Microbiology Reviews* 50: 609-640.
- Crossman LC, Castillo-Ramirez S, McAnnula C, Lozano L, Vernikos GS, Acosta JL, Ghazoui ZF, Hernandez-Gonzalez I, Meakin G, Walker AW, Hynes MF, Young JPW, Downie JA, Romero D, Johnston AWB, Davila G, Parkhill J, Gonzalez V. 2008. A common genomic framework for a diverse assembly of splasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS ONE* 2–3:e2567.
- Crutzen PJ, Lelieveld J. 2001. Human impacts on atmospheric chemistry. *Annual Review Earth Planet Science* 29:17-45.
- Csonka L N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 53: 121-147.
- Cubo TM, Buendia-Claveria AM, Beringer JE, Ruiz-Sainz JE. 1988. Melanin production by rhizobium strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1812-1817.
- Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield DE. 2005. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research Microbiology* 156: 457-464.
- Davidson EA, David MB, Galloway JN, Goodale CL, Haeuber R, Harrison JA, Howarth RW, Jaynes DB, Lowrance RR, Nolan BT, Peel JL, Pinder RW, Porter E, Snyder CS, Townsend AR, Ward MH. 2012. Excess nitrogen in the U.S. environment: Trends, Risks, and Solutions. *Issues in ecology* 15: 1-16.
- De Bruijn F. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7): 2180-2187.

- De Datta S, Obcemea W, Chen R, Calabio J, Evangelista R. 1987. Effect of water depth on nitrogen use efficiency and nitrogen-15 balance in lowland rice. *Agronomy Journal* 79: 210-216.
- Deambrosi E. 2003. The Uruguayan rice production system and its sustainability. En: *Proceedings of the 3rd International Temperate Rice Conference Punta del Este, Uruguay* pp 19.
- Deambrosi E, Méndez R, Avila S. 2000. Fertilización. En: *Arroz, Resultados experimentales 1999-2000*, Capítulo 5, INIA Treinta y Tres.
- Delgado MJ, Casella S, Bedmar E. 2007. Denitrification in rhizobia-legume symbiosis. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE. (Eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier. 83-91.
- Den Herder G, Parniske M. 2009. The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 12(4): 491-499.
- Denmead OT. 2008. Approaches to measuring fluxes of methane and nitrous oxide between landscapes and the atmosphere. *Plant and Soil* 309: 5-24.
- Díaz P, Borsani O, Monza J. 2005. *Lotus japonicus* related species and their agronomic importance. En: Márquez AJ. (Ed.). *Lotus Handbook*. Dordrecht: Springer-Verlag. 25-37.
- Dick J, Skiba U, Munro R, Deans D. 2006. Effect of N-fixing and non N-fixing trees and crops on NO and N<sub>2</sub>O emissions from Senegalese soils. *Journal of Biogeography* 33: 416-423.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Anuario Estadístico Agropecuario 2012. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Disponible en:  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,659,O,S,0,MNU;E;27;8;MNU;,%EF%BF%BD>
- DIEA (Dirección General de Investigación y Estadísticas Agropecuarias). 2011. Censo agropecuario. [En línea]. Disponible en:  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,694,O,S,0>. Consultado el 4 de agosto de 2013.

- DIEA (Dirección de Investigación y Estadísticas Agropecuarias). 2010. Encuesta Arroz Serie N° 291. 25 pp.
- DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente), MVOTMA, Unidad de cambio climático, Uruguay. 2010. Inventario nacional de gases de efecto invernadero 2004.
- DINAMA (Dirección Nacional de Medio Ambiente), MVOTMA, Unidad de cambio climático, Uruguay. 2006. Inventario nacional de gases de efecto invernadero 2002.
- Dobbie KE, Mc Taggart IP, Smith KA. 1999. Nitrous oxide emissions from intensive agricultural systems: variations between crops and seasons, key driving variables, and mean emission factors. *Journal of Geophysical Research* 104: 26891-26899.
- Dobermann A, Fairhurst T. 2000. Nutrient management En: IRRI and PPIC (Eds.). *Rice: Nutrient disorders and nutrient management*. Los Baños, Filipinas pp 191.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 2: 414-424.
- Doldán S. 2012. Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo, UdelaR. 53 pp.
- Dos Santos P, Fang Z, Mason S, Setubal J, Dixon R. 2012. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics* 13:162.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. Nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 89–98.
- Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, Ruíz O, Sanjuán J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado Tiver

- Basin (Argentina). *Applied and Environmental Microbiology* 75(4): 1088-1098.
- Fay P, Stewart WDP, Walsby AE, Fogg GE. 1968. Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae? *Nature* 220: 810 – 812.
- Ferguson SJ, Richardson DJ, van Spanning RJ. 2007. Biochemistry and molecular biology of nitrification. En: *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier. 209-222.
- Fernández T A, Iyer V, Apter SK. 1993. Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 899-904.
- Fernández-Valiente E, Ucha A, Quesada A, Leganés F, Carreres R. 2000. Contribution of N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from <sup>15</sup>N-labelled cyanobacteria and ammonium sulfate to rice. *Plant and Soil* 221: 109-114.
- Fiorda MV, Strauch SM, Villafaña VE, Helbling EW. 2011. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 103: 68-77.
- Fleming E D, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 9: 1448–1455 .
- Fleming H, Haselkorn R. 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase is synthesized in heterocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(10): 2727–2731.
- Flores E, Herrero A. 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8: 31-50.
- Flores-Félix JD, Carro L, Velázquez E, Valverde Á, Cerda-Castillo E, García-Fraile P, Rivas R. 2013. *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 63(3): 821-823.

- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 53: 341-356.
- Gamarra G. 1996. En: *Arroz, Manual de producción*. Montevideo, Uruguay. Hemisferio Sur (Ed.). 439 pp.
- García-Pichel F, Johnson SL, Youngkin D, Belnap J. 2003. Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid lands in the Colorado plateau. *Microbial Ecology* 46: 312 – 321.
- Giraud E, Fleischman D. 2004. Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynthesis Research* 82(2): 115-130.
- Goossens A, de Visscher A, Boeckx P. van Cleemput O. 2001. Two-year field study on the emission of N<sub>2</sub>O from coarse and middle-textured Belgian soils with different land use. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 60: 23-34.
- Goulding KWT, Webster CP, Powlson DS. 1996. Methane fluxes in aerobic soils. *Environment Monitoring Assessment* 42:175-187.
- Grant WF. 1995. A chromosome atlas and interspecific – intergenomic index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). *Canadian Journal of Botany* 73(11): 1787-1809.
- Gregerson RG, Lowell Robinson D, Vance CP. 1999. Carbon and nitrogen metabolism in *Lotus*. En: Beuselinck PR. (Ed.). *Trefoil: the science and technology of Lotus*, ASA-CSSA, CSSA special publication 28.167–185.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen W-M, Elliott G-N, Bontemps C, Estrada-de los Santos P, Gross E, Bueno dos Reis F, Sprent JI, Young PW, James EK. 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: . *Molecular plant-microbe interactions* 24(11): 1276-1288.
- Hadi A, Inubishi K, Yagi K. 2010. Effect of water management on greenhouse gas emissions and microbial properties of paddy soils in Japan and Indonesia. *Paddy Water Environment* 8: 319-324.
- Halbleib CM, Ludden PW. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of Nutrition* 130(5):1081-1084.

- Han TX, Han LL, Wu LJ, Chen WF, Sui XH, Gu JG, Wang ET, Chen WX. 2008. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 58: 2610–2618.
- Hardanson G, Golbs M, Danso SKA. 1989. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L. Merrill) as affected by nodulation patterns. *Soil Biology & Biochemistry*. 21: 783-787.
- He Y-Y, Häder D-P. 2002. Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66: 73-80.
- Heincke M, Kaupenjohann M. 1999. Effects of soil solution on the dynamics of N<sub>2</sub>O emissions: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 55: 133-157.
- Hénault C, Revellin C. 2011. Inoculants of leguminous crops for mitigating soil emissions of the greenhouse gas nitrous oxide. *Plant & Soil* 346: 289-296.
- Hernández S, Rebuffo M, Arrillaga S, Jaurena M, Labandera C, Risso D, Ciliuti J. 2005. Evaluation of the genotype-environment interaction in the establishment of *Lotus uliginosus* (Schkuhr) with soil cores. *Lotus Newsletter* 35(1): 120-130.
- Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E. 2004. Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Review* 28: 469-487.
- Hopkins DW, Dundee L, Webster EA, Simek M. 1997. Biological production and consumption of nitrous oxide in soils. *European Journal of Soil Biology* 33: 145-151.
- Hou AX., Chen GX, Wang ZP, van Cleemput O, Patrick WH. 2000. Methane and nitrous oxide emissions from a rice field in relation to soils redox and microbiological processes. *Soil Science Society of America Journal* 64: 2180-2186.



- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal* 54: 621-639.
- Hütsch BW. 2001. Methane oxidation in non-flooded soils as affected by crop production. *European Journal of Agronomy* 14: 237-260.
- Hütsch BW. 1998. Tillage and land use effects on methane oxidation rates and their vertical profiles in soils. *Biology and Fertility of Soils* 27: 284-292.
- ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes) Subcommittee on the Taxonomy of Rhizobium. 2013. [En línea]. 3 febrero 2014. <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>
- Iizumi T, Mizumoto M, Nakamura K. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaeae* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 3656-3662.
- Illarze G, Cerecetto V, Gutiérrez P, Irisarri P. 2013. Microorganismos productores de N<sub>2</sub>O en suelos arroceros: efecto del tipo de suelo y el manejo del agua. En: X Encuentro Nacional de Microbiólogos. Montevideo. p. 28.
- Inderjit, Kaushik S. 2010. Effect of herbicides with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. *Paddy water Environment* 8: 277-282.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2013. Summary for Policymakers. En: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III al Cuarto informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Ginebra: IPCC.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. Guidelines for national greenhouse gas inventories. Eggleston HS, Buendía L, Miwa K, Ngara T, Tanabe K (Eds.). Volume 4. Japan. p.1.6. Itoh M, Sudo S, Mori S, Saito H, Yoshida T, Shiratori Y, Suga S, Yoshikaw N, Suzue Y, Mizukami H,

- Mochida T, Yagi K. 2011. Mitigation of methane emissions from paddy fields by prolonging midseason drainage. *Agriculture Ecosystem Environment* 141: 359–372.
- Itakura M, Uchida Y, Akiyama H, Hoshino Y, Shimomura Y, Morimoto S, Tago K, Wang Y, Hayakawa C, Uetake Y, Sánchez C, Eda S, Hayatsu M, Minamisawa K. 2013. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change* 3:208-212.
- Itoh M, Sudo S, Mori S, Saito H, Yoshida T, Shiratori Y, Suga S, Yoshikawa N, Suzue Y, Mizukami H, Mochida T, Yagi K. 2011. Mitigation of methane emissions from paddy fields by prolonging midseason drainage. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 141: 359–372
- Jacinthe P-A, Dick W. 1997. Soil management and nitrous oxide emissions from cultivated fields in southern Ohio. *Soil Tillage Research* 35: 1584-1598.
- Jacobson MZ. 2005. *Atmospheric pollution: history, science and regulation*. Cambridge University Press, New York. 399 pp.
- Jain N, Dubey R, Dubey DS, Singh J, et al. 2013. Mitigation of greenhouse gas emission with system of rice intensification in the Indo-Gangetic Plains. *Paddy Water Environment* 12: 355-363.
- Jantalia CP, dos Santos H.P, Urquiaga S, Boddey RM, Alvez BJR. 2008. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 82: 161-173.
- Jiang, H, Gao K, Helbling E W. 2008. UV-absorbing compounds in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) with special reference to effects of desiccation. *Journal of Applied Phycology* 20: 387-395.
- Jones CM, Welsh A, Throback IN, Dörsch P, Bakken LR, Hallin S. 2011. Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N<sub>2</sub>- and N<sub>2</sub>O-producing *Bacillus* isolates harboring the nosZ gene. *FEMS Microbiology Ecology* 76(3): 551-562.
- Jourand P, Renier A, Rapior S, Miana de Faria S, Prin Y, Galiana A, Giraud E, Dreyfus B. 2005. Role of methylotrophy during symbiosis between

- Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. *Molecular Plant-microbe Interactions* 18(10): 1061-1068.
- Ju X-T, Xing G-X, Chen XP, Zhang S-L, Zhang L-J, Liu X-J, Cui Z-L, Yin B, Christie P, Zhu Z-L, Zhang F-S. 2009. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106(9): 3041-3046.
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K *et al* 2002. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Research* 7: 331–338.
- Kaschuk G, Hungria M, Andrade DS, Campo RJ. 2006. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology* 32(2): 210-220.
- Kerdchoechuen O. 2005. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. *Agriculture Ecosystems and Environment* 108: 155-163.
- Kessavalou A, Mosier AR, Doran JW, Dijber RA, Lyon DJL, Heinemeyer O. 1998. Fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide and methane in grass sod and winter wheat-fallow tillage management. *Journal of Environmental Quality* 27: 1094-1104.
- King GM. 1994. Associations of methanotrophs with the roots and rhizomes of aquatic vegetation. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3220-3227.
- Klöhn S, Hagemann M. 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 13: 551-562.
- Komárek J. 2010. Modern taxonomic revision of planktic Nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* 639: 231-243.
- Komárek J, Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. Munchen, Germany, Elsevier GmbH, 759 pp.

- Komárek J, Anagnostidis K. 1999. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 Nostocales. *Algological Studies*. 56: 247-345.
- Labandera C. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: Situación actual y perspectivas en Uruguay. En: Izaguirre-Mayoral ML, Labandera C, Sanjuán J. (Eds.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial*. Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. Montevideo: Denad Internacional SA. 75-78.
- Labandera C, Baraibar A, Milian A. 1982. Tecnología de Rhizobium. En: Anuario 1982. Plan Agropecuario, MGAP, Uruguay. *Trabajos Técnicos III*. pp. 11–15.
- Laguerre G, Courde L, Nouaïm R, Lamy I, Revellin C, Breuil MC, Chaussod R. 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microbial ecology* 52(3): 426-435.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuán J, Drouin P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981-993.
- Lashof D, Ahuja D. 1990. Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature* 344: 529-531.
- Latifi A, Ruiz M, Zhang C-C. 2008. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 258–278.
- Laughlin RJ, Stevens RJ. 2002. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Science Society of America Journal* 44: 1121-1123.
- Laurent S, Chen H, Bédu S, Ziarelli F, Peng L, Zhang CC. 2005. Non metabolizable analogue of 2-oxoglutarato elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 9907-9912.
- Le Mer J, Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *European Journal of Soil Biology* 37: 25-50.

- Ledgard SF, Steele KW. 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil* 141: 137-153.
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442: 806-809.
- Lewis GP. 2005. Tribu Caesalpiniae. En: *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew. Lewis B, Schire B, Mackinden, Lock M. (Eds.). pp35.
- Li H, Chen S, Mu B-Z, Gu J-D. 2010. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs. *Microbial Ecology* 10.1007/s00248-010-9733-3.
- Lin Y, Hirai M, Kashino Y, Koike H, Tuzi S, Satoh K. 2004. Tolerance to freezing stress in cyanobacteria, *Nostoc commune* and some cyanobacteria with various tolerances to drying stress. *Polar Bioscience* 17:56-68.
- Lindau CW, Bollich PK, Delaune RD, Patrick WH, Law, VJ. 1991. Effect of urea fertilizer and environmental factors on CH<sub>4</sub> emissions from a Louisiana, USA rice field. *Plant and Soil* 136: 195-203.
- Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Research in Microbiology* 161: 453-463.
- Linquist B, van Groenigen KJ, Adviento-Borbe MA, Pittelkow C, Van Kessel C. 2012. An agronomic assessment of greenhouse gas emissions from major cereal crops. *Global Change Biology* 18: 194–209.
- Lorite MJ, Videira e Castro I, Muñoz S, Sanjuán J. 2012. Phylogenetic relationship of *Lotus uliginosus* symbionts with bradyrhizobia nodulating genistoid legumes. *FEMS Microbiology Ecology* 79: 454-474.
- Lorite MJ, Donate-Correa J, Del Arco-Aguilar M, Pérez Galdona R, Sanjuán J, León-Barrios M 2010a. Lotus endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 282-290.

- Lorite MJ, Muñoz S, Olivares J, Soto MJ, Sanjuán J. 2010b. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4019-4026.
- Lüttge U. 2011. Cyanobacteria: multiple stresses, desiccation-tolerant photosynthesis and di-nitrogen fixation. En: Lüttge U *et al.* (Eds.). *Plant desiccation tolerance*, Ecological Studies 215, Berlin Heidelberg; Springer-Verlag. 23-43.
- MacAdam, JW, Griggs TC, Beuselinck PR, Grabber J H. 2006. Birdsfoot trefoil, a valuable tannin-containing legume for mixed pastures. En línea. *Forage and Grazinglands*. Open access.
- Macalady JL, McMillan AM, Dickens AF, Tyler SC, Scow KM. 2002. Population dynamics of type I and II methanotrophic bacteria in rice soils. *Environmental Microbiology* 4: 148 - 157.
- Madronich S, McKenzie RL, Björn LO, Caldwell MM. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 5-19.
- Mainaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Mauré L, Moulin L, Cleyet-Marel JC, Brunel B. 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 35(2): 65-72.
- Mancinelli RL. 1995. The regulation of methane oxidation in soil. *Annual Review of Microbiology* 49: 581-605.
- Martínez-Argudi I, Little R, Shearer N, Johnson P, Dixon R. 2004. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *Journal of Bacteriology* 186: 601-610.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* 17(10): 458-466.

- Mathieu S, Moreau P, Frendo A, Puppo MJ, Davies. 1998. Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radical Biology & Medicine* 24:1242–1249.
- Meeks JC, Elhai J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 66: 94-121.
- Merino P, Estavillo J M, Besga G, Pinto M, González-Murua C. 2001. Nitrification and denitrification derived N<sub>2</sub>O production from a grassland soil under application of DCD and Actilith F2. *Nutrient Cycling in Agrosystems* 60: 9-14.
- Mesa J, Alché D, Bedmar EJ, Delgado MJ. 2004. Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiologia Plantarum* 120: 205–211.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106: 3–19.
- Minamikawa K, Sakai N. 2006. The practical use of water management based on soilredox potential for decreasing methane emissions from a paddy field in Japan *Agriculture Ecosystem Environment* 116: 181–188.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19.
- Montañez A, Labandera C, Solari L. 2003. Nitrogen fixation on a national scale. *Leisa Magazine* 19: 9.
- Monza J, Díaz P, Borsani O, Ruiz Argüeso T, Palacios JM. 1997. Evaluation and improvement of the energy efficiency of nitrogen fixation in *Lotus corniculatus* nodules induced by *Rhizobium loti* strains isolated from uruguayan soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 565 – 571.

- Monza J, Fabiano E, Arias A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biology & Biochemistry* 24(3): 241-247.
- Moreno-Vivian C, Ferguson S. 1998. Definition and distinction between assimilation, dissimilation and respiratory pathways. *Molecular Microbiology* 29: 661-669.
- Mosier AR, Peterson GA, Sherrod LA. 2003. Mitigating net global warming potential in upland crop production. En: *Methane and Nitrous oxide International Workshop Proceedings, Beijing, China November 2003*, pp 273-280.
- Mosier AR. 1998. Soil processes and global change. *Biology and Fertility of Soils* 27:221-229.
- Mosier AR, Kroeze C, Nevison C, Oenema O, Seitzinger S, van Cleemput O. 1998. Closing the global N<sub>2</sub>O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 52: 225-248.
- Mosier AR, Duxbury JM, Freney JR, Heinemeyer O, Minami K. 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: assessment, measurement and mitigation. *Plant and Soil* 181: 95-108
- Mosier AR, Schimel D, Valentine D, Bronson K, Parton W. 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* 350: 330-332.
- Mosier AR, Schimel D, Valentine D, Bronson K, Parton W. 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* 350: 330-332.
- Müller C, Stevens RJ, Laughlin RJ, Jäger H-J. 2004. Microbial processes and the site of N<sub>2</sub>O production in a temperate grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 453-461.
- Murray RE, Knowles R. 2004. Trace amounts of O<sub>2</sub> affect NO and N<sub>2</sub>O production during denitrifying enzyme activity (DEA) assays. *Soil Biology and Biochemistry* 36(3): 513-517.



- Neira M. 1995. Manual técnico de fijación simbiótica de nitrógeno: leguminosa-Rhizobium. Roma: FAO (1985), p. irr.
- Neue HU. 1997. Fluxes of methane from rice fields and potential for mitigation. *Soil Use and Management* 13: 258-267.
- Newton WE. 2007. Physiology, biochemistry, and molecular biology of nitrogen fixation. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE. (Eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier. 109-126.
- Nielsen RL. 2006. Loss mechanisms and nitrogen use efficiency. En: *Purdue Nitrogen Management Workshops*, University of Purdue. pp 1-5.
- Olander L, Wallenberg E, Tubiello F, Herold M. 2013. Advancing agricultural greenhouse gas quantification. *Environmental Research Letters* 8 (1):1002 (7pp). Open access.
- Olivares J, Soto M J, Arrese-Igor C, Sanjuán J. 2011. Nitrogen fixation in legumes. Perez de la Vega M, Torres AM, Cubero JI, Kole C. (Eds.). *Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes*. Lebanon: Science Publishers Inc. 355-379.
- Oren A, Gunde-Cimerman N. 2007. Mycosporines and mycosporine-like aminoacids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters* 269: 1–10.
- Pariasca Tanaka J, Nardi P, Wissuwa M. 2010. Nitrification inhibition activity, a novel trait in root exudates of rice. *AoB Plants* 3: plq014-plq014.
- Parkin TB, Venterea RT. 2010. Sampling Protocols. Chapter 3. Chamber-based trace gas flux measurements. En: Follet RF (Ed.). *Sampling Protocols*. p. 3-1 to 3-39. Disponible en: [www.ars.usda.gov/research/GRACENet](http://www.ars.usda.gov/research/GRACENet)
- Pasda G, Händel R, Zerulla W. 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biology and Fertility of Soils* 34: 85-97.
- Passianoto CC, Ahrens T, Feigl BJ, Steudler PA, Do Carmo JB, Melillo J M.. 2003. Emissions of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and NO in conventional and no-till management practices in Rondônia, Brazil. *Biology and Fertility of Soils* 38(4): 200-208.

- Pawlowsky K, Bergman B. 2007. Plant symbioses with Frankia and cyanobacteria. En: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE. (Eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier. 165-178.
- Peng SB, Buresh RJ, Huang JL, Yang JC, Zou YB, Zhong XY, Wang GH, Zhang FS. 2006. Strategies for overcoming low agronomic nitrogen use efficiency in irrigated rice systems in China. *Field Crops Research* 96(1): 37–47.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 64: 180–201.
- Peterson SO, Regina K, Pöllinger A, Rigler E, Valli L, Yamulki S, Esala M, Fabbri C, Syväsalo E, Vnther FP. 2006. Nitrous oxide emissions from organic and conventional crop rotations in five european countries. *Agriculture Ecosystem Environment* 112: 200-206.
- Philippot L, Germon JC. 2005. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. En: Buscot F, Varma A. (Eds.). *Microorganisms in soils Roles in genesis and functions*. Berlín: Springer-Verlag. 159-176.
- Potts M, Slaughter SM, Hunneke F, Garst JF, Helm RF. 2005. Desiccation tolerance of prokaryotes: Application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology* 45: 800–809.
- Prasanna R, Kumar R, Sood A, Prasanna BM, Singh P K. 2006. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. *Microbiology Research* 161: 187-202.
- Prendergast- Miller MT, Baggs EM, Johnson D. 2011. Nitrous oxide production by the ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* and *Tylospora fibrillosa*. *FEMS Microbiology Letters* 3156 : 31-35.
- Quesada A, Leganés F, Fernández-Valiente E. 1997. Environmental factors controlling N<sub>2</sub> fixation in mediterranean rice fields. *Microbiology Ecology* 34: 39-48.
- Quesada A, Sánchez-Maeso E, Fernández-Valiente E. 1989. New incubation device for *in situ* measurements of acetylene-reducing activity in rice fields. *Journal of Applied Phycology* 1: 195-200.

- Ramsay JP, Sullivan JT, Stuart GS, Lamont IL, Ronson CW. 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase ElxS. *Molecular Microbiology* 62(3): 723-734.
- Rebuffo M, Benhaja M, Risso D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: State of art in Uruguay. *Lotus Newsletter* 3: 22-23.
- Rebuffo M, Condon F, Alzugaray R. 2005. Variedades criollas de forrajeras templadas: conservación y uso en mejoramiento genético. *Agrociencia* (Uruguay), v.1 y2: 105 – 114.
- Reddy P, Roger P, Ventura W, Watanabe I. 1986. Blue-green algal treatment and inoculation had no significant effect on rice yield in an acidic wetland soil. *Phillipines Agriculture* 69: 629-632.
- Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. 1997. N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum- dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26627–26633.
- Rich JJ, Dale OR, Song B, Ward BB. 2008. Anaerobic ammonium oxidation in Chesapeake Bay sediments. *Microbial Ecology* 55: 311-320.
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. 1979. Generic assignment, strain stories and properties of pure culture of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- Risso DF, Carámbula M. 1998. Lotus El Rincón. Producción y utilización de los mejoramientos. INIA, Boletín de divulgación 65. 32p.
- Robertson GP, Paul EA, Harwood RR. 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289: 1922-1925.
- Rochette P. 2011. Towards a standard NSS chamber methodology for measuring soil N<sub>2</sub>O emissions. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 141-146.

- Rochette P, Eriksen-Hamel NS. 2008. Chamber measurements of soil nitrous oxide flux: are absolute values reliable? *Soil Science Society of America Journal* 72: 331-342.
- Rochette P, Janzen HH. 2005. Towards a revised coefficient for estimating N<sub>2</sub>O emissions from legumes. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 73: 171-179.
- Roger PA. 1995. Biological N<sub>2</sub>-fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertilizer Research* 42: 261-276.
- Roger PA, Ladha JK. 1992. Biological N<sub>2</sub> fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant and Soil* 141: 41-55.
- Rolston DE. 1986. Gas flux. En: Klute A. (Ed.). *Methods of Soil Analysis, Part 1., Physical and Mineralogical Methods*. Pp. 1103-1119. *Agronomy Monograph no. 9* (2nd edition), Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA.
- Rubio LM, Ludden PW. 2008. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology* 62: 93–111.
- Ruiz-Argüeso T, Imperial J, Palacios JM. 2000. Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. En: Triplett EW. (Ed.). *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham. 489–507.
- Sánchez M, Ramírez-Bahena MH, Peix A, Lorite MJ, Sanjuán J, Velázquez E, Monza J. 2013. *Phyllobacterium loti* sp. nov. isolated from nodules of *Lotus corniculatus* in Uruguay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:781-786
- Santamaría M, Agius F, Monza J, Gutiérrez-Navarro AM, Corzo J. 1999. Comparative performance of enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction and lipopolysaccharide electrophoresis for the identification of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strains. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 163-168.
- Sassi-Aydi S, Aydi S, Abdelly C. 2012. Inoculation with the native *Rhizobium gallicum* 8a3 improves osmotic stress tolerance in common bean drought-

- sensitive cultivar. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 62 (2): 179-187.
- Schlesinger WH. 2009. On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (1): 203-208.
- Schütz H, Seiler W, Conrad R. 1989. Processes involved in formation and emission of methane in rice paddies. *Biogeochemistry* 7: 33-53.
- Shannon CE, Weaver W. 1949. *The mathematical theory of communication*. Urbana: The University of Illinois Press. 177 p.
- Sheehy J, Mnzava M, Cassman K, Mitchell P, Pablico P, Robles R, Samonte H. 2004. Temporal origin of nitrogen in the grain of irrigated rice in the dry season: the outcome of uptake, cycling, senescence and competition studied using <sup>15</sup>N-point placement technique. *Field Crop Research* 89: 337-348.
- Shibata K. 1969. Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant and Cell Physiology* 10: 325-335.
- Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, et al. 2013. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110:1053-1058.
- Shoun H, Fushinobu S, Jiang L, Kim S-W, Wakagi T. 2012. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 1186-1194.
- Silva Pinto F, Hungria M, Mercante FM. 2007. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 39(8):1851–1864.
- Simon J. 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 285–309.
- Singh S, Datta P. 2013. Evaluation of biofertilizer potentiality of ammonia excretory multiple herbicide resistant strain of *Anabaena variabilis* on growth and

- productivity of rice. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 3(4): 132-139.
- Singh SC, Sinha RP, Häder D-P. 2002. Role of fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta Protozoologica* 41: 297-308.
- Sinha RP, Häder D-P. 2008. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science* 174: 278-289.
- Sinha RP, Häder D-P. 2006. Impact of UV radiation on rice-field cyanobacteria: Role of photoprotective compounds. En: Ghetti F, Checcucci G, Bornman JF (Eds.) *Environmental UV radiation: Impact on ecosystems and human health and human health predictive models*. New York, Plenum Press pp. 217-230.
- Sinha R, Häder D. 1996. Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 64: 887-896.
- Smith KA. 1999. After the Kyoto protocol: Can soil scientists make a useful contribution? *Soil use and management* 15: 71-75.
- Smith RC, Prezelin BB, Baker KS, *et al.* 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic water. *Science*, 225: 952–959.
- Snyder CS, Bruulsema TW, Jensen TL. 2007. Greenhouse gas emissions from cropping systems and the influence of fertilizer management – A Literature Review. International Plant Nutrition Institute, Norcross, GA.
- Sprent JI. 2009. Nodulation in a taxonomic concept. En: Sprent JI. (Ed.). *Legume nodulation A global perspective*. Oxford: John Wiley & Sons Ltd. 1-31.
- Starkenburg SR, Spieck E, Bottomley PJ. 2011. Metabolism and genetics of nitrite-oxidizing bacteria: Emphasis on studies of pure cultures and of *Nitrobacter* species. En: Ward BB, Arp DJ, Klotz MG. (Eds.). *Nitrification*. Washington: ASM Press. 267-293.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van des Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 440: 446-449.

- Subbarao GV, Nakahara K, Hurtado MP, Ono H, Moreta DE, Salcedo AF, Yoshihashi AT, Ishikawa T, Ishitani M, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Rondon M, Rao IM, Lascano CE, Berry WL, Ito O. 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A 106(41): 17302-17307.
- Subbarao GV, Rondon M, Ito O, Ishikawa T, Rao IM, Nakahara K, lascano C, Berry WL. 2007. Biological nitrification inhibition (BNI)—is it a widespread phenomenon? Plant and Soil 294: 5-18.
- Subbarao GV, Ishikawa T, Ito O, Nakahara K, Wang HY, Berry WL. 2006. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. Plant and Soil 288: 101-112.
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, Gouzy J, Brown SD, Elliot RM, Fleetwood DJ, McCallum NG, Rossbach U, Stuart GS, Weaver JE, Webby RJ, De Bruijn FJ, Ronson CW. 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. Journal of Bacteriology 184: 3086-3095.
- Sullivan JT, Ronson CW. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5145–5149.
- Sutka RL, Adams GC, Ostrom NE, Ostrom PH. 2008. Isotopologue fractionation during N<sub>2</sub>O production by fungal denitrification. Rapid Communications in Mass Spectrometry 22(24): 3989–3996.
- Thomson AJ, Giannopoulos G, Pretty J, Baggs EM, Richardson. 2012. Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies yo mitigate emissions. Philosophical Transactions of the Royal Society B 357: 1157-1168.
- Thorman R, Chadwick DR, Harrison R, Boyles LO, Matthews R. 2007. The effect on N<sub>2</sub>O emissions of storage conditions and rapid incorporation of pig and cattle farmyard manure into tillage land. Biosystems Engeneering 97: 501–511.

- Tichy M, Vermaas W. 1999. In vivo role of catalase-peroxidase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 181: 1875-1882.
- Toresani S, Bodrero M, Enrico JM. 2007. Comportamiento de inoculantes para soja en la zona sur de la Provincia de Santa Fé, Argentina. *Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias* 11, Universidad Nacional de Rosario. <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev11/3.htm>
- Towprayoon S, Smakgahn K, Poonkaew S. 2005. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. *Chemosphere* 59: 1547-1556.
- Towprayoon S, Harvey NW, Jittasatra O, Kerdchuchean O. 2000. Influence of rice variety and soil type on production and emission of methane from rice fields. *Asian Journal of Energy and Environment* 1: 251–262.
- Tyagi L, Kumari B, Singh SN. 2010. Water management – A tool for methane mitigation from irrigated paddy fields. *Science of the Total Environment* 408: 1085-1090.
- Ussiri D, Lal R. 2013. Formation and release of nitrous oxide from terrestrial and aquatic ecosystems. En: Ussiri D, Lal R (Eds.). *Soil emission of nitrous oxide and its mitigation* pp 63-96.
- Vaishampayan A, Sinha R , Häder D, Dey T, Gupta A, Bhan U, Rao L. 2001. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *Botanical Reviews* 67: 453-516.
- Valverde A, Velásquez E, Fernández-Santos F, Vizcaíno N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1985-1989.
- van Berkum P, Fuhrmann JJ. 2000. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2165-2172.



- van Bodegom P, Stams F, Mollema L, Boeke S, Leffelaar P. 2001. Methane oxidation and the competition for oxygen in the rice rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3586-3597.
- van Groenigen JW, Velthof GL, Oenema O, van Groenigen KJ, Van Kessel C. 2010. Towards an agronomic assessment of N<sub>2</sub>O emissions: a case study for arable crops. *European Journal of Soil Science* 61: 909-913.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 60: 407-439.
- Venterea RT, Burger M, Spokas KA. 2005. Nitrogen oxide and methane emissions under varying tillage and fertilizer management. *Journal of Environmental Quality* 34: 1467-1477.
- Vinuesa P, Rojas-Jiménez K, Contreras-Moreira B, Mahna SK, Prasad BN, Moe H, Selvaraju SB, Thierfelder H, Werner D. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6987-6996.
- Wagner-Riddle C, Thurtell GW, Kidd GK, Beauchamp EG, Sweetman R. 1997. Estimates of nitrous oxide emissions from agricultural fields over 28 months. *Canadian Journal of Soil Science* 77(2): 135-144.
- Waibel A, Peter T, Carslaw K, Oehlf H, Wetzell G, Crutzen P, Poschl U, Tshas A, Reimar E, Fisher H. 1999. Arctic ozone loss due to denitrification. *Science* 283: 2064-2069.
- Wang E, Chen WX. 2004. Estimation of biotic and abiotic factors that affect migration of rhizobia. In: Werner D. (Ed.). *Biological Resources and Migration*. Berlin: Springer Verlag. 167-171.
- Wassmann R, Lantin RS, Neue HU, Buendia LV, Corton TM, Lu Y. 2000. Characterization of methane emissions from rice fields in Asia. III. Mitigation options and future research needs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 58: 23-36.

- Watanabe I, Hashimoto T, Shimoyama A. 1997. Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Biology and Fertility of Soils* 24: 261-265.
- Watanabe A, Yamamoto Y. 1971. Algal nitrogen fixation in the tropics. *Plant and Soil Special Issue*: 403-413.
- Weiske A, Benckiser G, Herbert T, Ottow JCG. 2001. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biology and Fertility of Soils* 34: 109–117.
- Werner D. 1992. *Symbiosis of Plants and Microbes*. London; Glasgow; New York; Tokyo; Melbourne; Madras. Chapman and Hall (Ed.). p. 350.
- Whitton B, Potts M. 2000. Introduction to the cyanobacteria. En: *The ecology of cyanobacteria*. Whitton B A, Potts M. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. 1-9.
- Williams DL, Ineson P, Coward PA. 1999. Temporal variations in nitrous oxide fluxes from urine-affected grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 31:779-788.
- Willison TW, Goulding KWT, Powlson .S. 1995. Effect of land-use change and methane mixing ratio on methane uptake from United Kingdom soil. *Global Change Biology* 1: 209-212.
- Wolk CP, Ernst A, Elhai J. 1994. Heterocyst metabolism and development. En: Bryant DA. (Ed.). *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 769-823.
- Wozniak RA, Waldor MK. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews/Microbiology* 8: 552-562.
- Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1723-1732.

- Xiong Z-Q, Xing G-X, Zhu Z-L. 2007. Nitrous oxide and methane emissions as affected by water, soil and nitrogen. *Pedosphere* 17(2): 146-155.
- Xu GH, Fan XR, Miller AJ. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153-182.
- Xu X, Elhai J, Wolk CP. 2008. Transcriptional and developmental response by *Anabaena* to deprivation of fixed nitrogen. En: Herrero A. & Flores E. (Eds.). *The cyanobacteria. molecular biology, genomics and evolution*. Norfolk: Caister Academic Press. 383-422.
- Yagi K, Tsuruta H, Kanda K, Minami K. 1996. Effect of water management on methane emission from a Japanese rice paddy field: Automated methane monitoring. *Global Biogeochemical Cycles* 10: 255-267.
- Yan X, Yagi K, Akiyama H, Akimoto H. 2005. Statistical analysis of the major variables controlling methane emission from rice fields. *Global Change Biology* 11: 1131–1141.
- Yanni YG. 1996. Contribution of cyanobacterization to rice growth and performance under different field stand densities and levels of combined nitrogen. En: Rahnan M, Kumar A, van Hove C, Begum ZN, Heulin T, Hartmann A. (Eds.). *Biological nitrogen fixation associated with rice production*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 133-139.
- Yanni YG, Sehly MR. 1991. Rice performance and natural infection with blast (*Pyricularia oryzae* Cav.) under different algalization techniques and rates of fertilizer nitroge, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 7: 43-47.
- Yu KW, Wang ZP, Chen GX. 1997. Nitrous oxide and methane transport through rice plants. *Biology and Fertility of Soils* 24: 341–3.
- ZhaoX, Min J, Wang S, Shi W, Xing G. 2011. Further understanding of nitrous oxide emission from paddy fields under rice/wheat rotation in south China. *Journal of Geophysical Research* 116: G02016.
- Zeeshan M, Prasad SM. 2009. Differential response of growth, photosynthesis, antioxidant enzymes and lipid peroxidation to UV-B radiation in three cyanobacteria. *South African Journal of Botany* 75: 466-474.

- Zehr JP, Montoya JP. 2007. Measuring N<sub>2</sub> fixation in the field. En: Bothe H, Ferguson S, Newton WE. (Eds.). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier. 193-205.
- Zengeni R, Mpeperekwi, S, Giller KE. 2006. Manure and soil properties affect survival and persistence of soybean nodulating rhizobia in smallholder soils of Zimbabwe. *Applied Soil Ecology* 32: 232-242.
- Zhang P-Y, Yu J, Tang X-X. 2005. UV-B radiation suppresses the growth and antioxidant systems of two marine microalgae, *Platymonas subcordiformis* (Wille) Hazen and *Nitzschia closterium* (Ehrenb.) W. Sm. *Journal of Integrative Plant Biology* (Formerly *Acta Botanica Sinica*) 47: 683–691.
- Zhu G, Jetten MSM, Kusch P, Ettwig KF, Yin C. 2010. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 86: 1043-1055.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Research* 61(4): 533-616.

## **8. ANEXO**

**8.1. CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA NODULATING *Lotus subbiflorus* FROM URUGUAYAN SOILS**

**8.2. DENITRIFICATION ABILITY OF RHIZOBIAL STRAINS ISOLATED FROM *Lotus* sp.**

**8.3. DIVERSITY OF RHIZOBIA NODULATING *Lotus corniculatus* GROWN IN NORTHERN AND SOUTHERN REGIONS OF URUGUAY**

**8.4. DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS CON HETEROCISTOS EN SUELOS CULTIVADOS CON ARROZ**

**8.5. CYANOBACTERIA IN URUGUAYAN RICE FIELDS: DIVERSITY, NITROGEN FIXING ABILITY AND TOLERANCE TO HERBICIDES AND COMBINED NITROGEN**

**8.6. ROLE OF CYANOBACTERIA AS BIOFERTILIZERS: POTENTIALS AND LIMITATIONS**

**8.7. CYANOBACTERIAL INOCULATION AND NITROGEN FERTILIZATION IN RICE**

**8.8. DIFFERENTIAL RESPONSE TO MODERATE UV-B IRRADIATION OF TWO HETEROCYSTOUS CYANOBACTERIA ISOLATED FROM A TEMPERATE RICEFIELD**

**8.9. NITRIFICATION AND DENITRIFICATION ASSOCIATED WITH N<sub>2</sub>O PRODUCTION IN A TEMPERATE N-FERTILIZED IRRIGATED URUGUAYAN RICEFIELD**

**8.10. EMISIONES DE ÓXIDO NITROSO POR SUELOS CULTIVADOS CON ARROZ: EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA NITRIFICACIÓN**

**8.11. NITROUS OXIDE EMISSIONS FROM AN URUGUAYAN ARGUDOLL UNDER DIFFERENT TILLAGE AND ROTATION TREATMENTS**

**8.12. EMISIONES DE CH<sub>4</sub> Y N<sub>2</sub>O EN UN ARROZAL: PRIMERAS MEDIDAS EN EL SISTEMA PRODUCTIVO URUGUAYO**

**8.13. YIELD-SCALED GLOBAL WARMING POTENTIAL OF TWO IRRIGATION MANAGERMENTS IN A HIGHLY PRODUCTIVE RICE SYSTEM IN URUGUAY**

## Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils

P. Irisarri<sup>1</sup>, F. Milnitsky<sup>1</sup>, J. Monza<sup>1</sup> and E.J. Bedmar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Departamento de Bioquímica, Garzón 780, 12900-Montevideo, Uruguay and

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zedín, CSIC, PO Box 419, 18080-Granada, Spain\*

Received 14 August 1995. Accepted in revised form 12 January 1996

**Key words:** *Bradyrhizobium*, carbon utilization, ELISA, *Lotus subbiflorus*, native isolates, protein profiles, *Rhizobium*, symbiotic effectiveness

### Abstract

Generation times, acid production, carbon utilization, immunological properties, plasmid content, protein profile and symbiotic properties of 15 isolates of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* were studied. Based on specific growth rates, carbon source utilization and acid production, 13 out of the 15 isolates could be assigned to the slow-growing group of rhizobia (bradyrhizobia). Using antisera against whole cells of three isolates, we separated the 15 isolates into three serogroups. Only the slow-growing isolate Ls4 and the fast-growers Ls5 and Ls552 lacked cross-reactivity with any of the sera tested. Electrophoretic mobilities of whole cell protein from seven out of the eight isolates included in the serogroup represented by strain Ls31 were identical. Similarly, isolates Ls1B3 and Ls1B4, both in serogroup Ls1B3, had the same pattern of cell proteins. In contrast, isolates Ls3 and Ls7, belonging to serogroup Ls7, differed in protein profile. Plant growth experiments carried out under bacteriologically controlled conditions revealed that all of the isolates effectively nodulated *L. subbiflorus* and *L. pedunculatus*, but were unable to form effective nodules on *L. tenuis* and *L. corniculatus*. All isolates showed similar effectiveness in symbiosis with *L. subbiflorus*, except isolate Ls7, which gave significantly higher plant dry weight.

**Abbreviations:** ELISA – enzyme linked immuno-sorbent assay, kDa – kiloDalton, MM – mineral medium, PBS – phosphate-buffered saline, RE – relative efficiency, SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, YEM – yeast extract mannitol.

### Introduction

Within the Rhizobiaceae, bacteria capable of nodulating *Lotus* species include both fast-growing (*Rhizobium loti*) and slow-growing (*Bradyrhizobium* spp.) strains (Jarvis et al., 1982; Jordan, 1982, 1984). Strains of *R. loti* so far examined exhibit symbiotic promiscuity as they establish N<sub>2</sub>-fixing associations not only with *Lotus* spp., but also with a variety of other legumes (Jordan et al., 1982; Pankhurst, 1977; Pankhurst et al., 1979).

Among *Lotus* spp. widely cultivated as pasture legume in Uruguay, *L. subbiflorus* is of special interest

because of its ability to grow in soils of low water and nutrient availability and because its high quality and excellent persistence makes it a very promising variety to improve the forage production of natural pastures (Asuaga, 1994). In contrast to *L. corniculatus* and *L. tenuis*, which form effective N<sub>2</sub>-fixing nodules when inoculated with fast-growing *R. loti* species, *L. subbiflorus* forms tumour-like structures that do not contain bacteroids (Monza et al., 1992a). It is therefore rather difficult to establish a pasture of *L. subbiflorus* in a field with a long *L. corniculatus* history. Only the commercial, fast-growing strain NZP2O37, which forms effective nodules on *L. tenuis* and *L. pedunculatus* (Pankhurst, 1977), has been shown to fix atmospher-

\* FAX No: + 34 58 129600

ic N<sub>2</sub> in symbiosis with *L. subbiflorus* (Russell et al., 1990). Currently, little is known about the native population of *L. subbiflorus* rhizobia in Uruguayan soils. The present study reports on the generation time, acid production, carbon utilization, immunological properties, plasmid content, protein profile and symbiotic properties of 15 indigenous rhizobia isolates nodulating *Lotus subbiflorus*.

## Materials and methods

### Bacterial strains

*Rhizobium loti* strain NZP2037 and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) strain NZP2309, used in this study as reference strains for fast- and slow-growing rhizobia, respectively, were obtained from the Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston South, New Zealand, and from the Department of Microbiology, University of New South Wales, Kensington, Australia, respectively. Isolates of *L. subbiflorus* were obtained after screening of eight representative soils located in different areas in Uruguay (Baraibar et al., 1988). Isolates Ls11, Ls22, Ls31, Ls42, Ls71, Ls81, Ls82 and Ls552 were from the locality of Florida, and isolates Ls3, Ls4, Ls5, Ls7, LsS3, Ls1B3 and Ls1B4 from the locality of Durazno. Rhizobial isolates able to nodulate *L. subbiflorus* were not found in the remaining soil sites. Isolation procedures and characteristics of the soils have been described previously (Baraibar et al., 1988). Bacteria were maintained asymbiotically on yeast-extract mannitol (YEM) medium (Vincent, 1970).

### Plant material and growth conditions

Seeds of *Lotus subbiflorus* var. Rincón, *L. corniculatus*, *L. tenuis* and *L. pedunculatus* were surface-sterilized, germinated and planted in autoclaved Leonard jar assemblies filled with vermiculite as previously indicated (Monza et al., 1992b). Plants were inoculated at sowing with 1 mL of a single commercial strain or isolate (approximately 10<sup>8</sup> cells mL<sup>-1</sup>) and provided with sterile N-free nutrient solution (Rigaud and Puppo, 1975). Plants (6 plants per jar) were grown under greenhouse conditions. A 16/8 h light/dark photoperiod and 25/18°C were used. Supplementary light was provided by Sylvania incandescent and cool-white lamps (500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 400–700 nm, at the plant tops).

### Generation times and acid production

Doubling times were calculated from the exponential growth phase of cultures grown in YEM broth according to Martínez de Drets et al. (1974). Optical density (A = 620 nm) readings were made every 2 h. Native isolates and reference strains were examined for acid or alkaline production after growth for 2 d (fast-growing isolates) or 6 d (slow-growing isolates) as indicated earlier (Monza et al., 1992b).

### Carbon source utilization

The utilization of monosaccharides (D-glucose, D-galactose, and D-xylose), polyols (glycerol and mannitol), disaccharides (lactose, raphinose, sucrose, maltose, cellobiose, and melibiose), carboxylic acids (succinate, pyruvate, and fumarate) and aromatic compounds (phenolic acid, salicylic acid, ferulic acid and cumaric acid) was determined as described by Arias et al. (1979).

For determination of carbon source utilization, cells were cultured in liquid YEM medium, collected by centrifugation at 8000 g for 10 min at 4°C, washed twice with 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7, containing 150 mM NaCl and 3 mM KCl (PBS buffer), and finally resuspended in the mineral medium (MM) described by Vincent (1970). Aliquots containing approximately 10<sup>8</sup> cells were used to inoculate 5 mL of liquid MM medium containing 5 mM KNO<sub>3</sub> and the appropriate carbon source at a final concentration of 10% (w/v). When aromatic compounds were used as carbon sources, stock solutions were prepared in ethanol and added to the MM medium at a final concentration of 20 mM.

### Antisera production and adsorption

Antisera production and adsorption were carried out essentially as described by Monza et al. (1992b). Whole cells of isolates Ls31, Ls7 and Ls1B3 were used to elicit antibodies, separately. Bacteria were grown in liquid YEM, harvested by centrifugation and washed five times in PBS. A bacterial suspension (10<sup>3</sup> cells mL<sup>-1</sup>) was emulsified with Freund's incomplete adjuvant (1:1), and then 1 mL was injected subcutaneously into five places on the rabbit's back. Rabbits were subcutaneously boosted 6 weeks later with 0.5 mL of the same bacterial suspension. Bleedings were carried out 1 week later. Undiluted antisera (0.8 mL) were treated with 0.2 mL of a concentrated suspension of the cor-

responding adsorbing cells ( $10^{11}$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) in PBS containing 0.05%  $\text{NaN}_3$  overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Cells were then sedimented by centrifugation (twice at  $12000\text{ g} \times 15\text{ min}$ ) and the clear supernatant was tested by ELISA against the adsorbing and remaining strains or isolates.

#### ELISA

All strains and isolates were tested by the indirect ELISA method (Wright, 1986) using antisera raised against isolates Ls31, Ls7 and Ls1B3. The appropriate antigen suspended in PBS ( $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) was used for plate coating. Goat antirabbit-IgG conjugated with alkaline phosphatase and the substrate  $p$ -nitrophenyl phosphate were used. Optical densities ( $A = 405\text{ nm}$ ) were read with a Titertek multiscan reader after 30 min at room temperature, using substrate solution as a blank. Appropriately diluted rabbit nonimmune serum served as the negative control.

#### SDS-PAGE of whole cell proteins

Protein profile of each isolate was assayed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Bacteria were grown in liquid YEM medium, collected by centrifugation and washed twice with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Samples containing 10–20 mg protein  $\text{mL}^{-1}$  were prepared as described by Wright et al. (1986). For SDS-PAGE, the discontinuous buffer system of Laemmli (1970) was used. The stacking gel was 5% (w/v) acrylamide and the resolving SDS-containing gel was 10% (w/v) acrylamide.

#### Plasmid content

Plasmid content of the isolates was analyzed by a modification (Rosemberg et al., 1981) of the Eckhardt procedure (1978) in which 0.7% agarose vertical gels were used. *R. loti* NZP2037 carrying a 240 MDa plasmid (Pankhurst et al., 1983) and *R. meliloti* GR4 containing three plasmids of 114 MDa, 140 MDa and > 1000 MDa (Toro and Olivares, 1986) were used as reference strains.

#### Hybridization experiments

Physical verification of *hup* genes in each isolate was carried out by DNA hybridization analysis (Sambrook et al., 1989). Isolation of total DNA from bacteria was performed essentially as described by Corbin et

al. (1982). After isolation, genomic DNA was enzymatically digested to completion with *EcoRI*. The probe used was the internal *SaII* fragment containing *hup* structural genes of *R. leguminosarum* bv. *viceae* UPM791 (Leyva et al., 1987). Hybridization was performed with a non-radioactive detection kit (Boehringer, Mannheim, Germany), and the chemiluminescence method was used to detect hybridization bands.

#### Physiological assays and symbiotic effectiveness

Nitrogenase activities were measured on detached root systems excised at the cotyledonary node of 45-day-old *L. subbiflorus* plants. Hydrogen evolution in air and  $\text{C}_2\text{H}_2$ -dependent  $\text{C}_2\text{H}_4$  production ( $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction) were assayed sequentially within 35 min after shoot excision, when  $\text{C}_2\text{H}_2$  reduction activities were linear. A gas chromatograph equipped with a thermistor detector was operated with a Molecular Sieve 5A (80–100 mesh) column ( $0.5 \times 185\text{ cm}$ ) to measure  $\text{H}_2$ . Oven temperature was  $90^\circ\text{C}$ , and Ar flowing at  $80\text{ mL min}^{-1}$  served as the carrier gas. Ethylene was measured on the same gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. A Porapak Q (60–80 mesh) column ( $0.5 \times 90\text{ cm}$ ), oven temperature  $50^\circ\text{C}$ , and  $\text{N}_2$  as carrier gas at  $60\text{ mL min}^{-1}$  were used. Root systems were incubated for 10 min in 100-mL bottles before measuring  $\text{H}_2$ . The bottles were then opened to air for 30 s before sealing with serum caps. Ten mL of the internal atmosphere were removed from each bottle and replaced with 10 mL of  $\text{C}_2\text{H}_2$  in air. Bottles were sampled for  $\text{C}_2\text{H}_4$  after 10 and 20 min. Relative efficiency (RE) of nitrogenase was calculated according to the equation  $\text{RE} = 1 - \text{hydrogen evolved in air/acetylene reduced}$  (Schubert and Evans, 1976). Plant dry weight was determined on plants that had been heated at  $80^\circ\text{C}$  for 48 h.

## Results and discussion

#### Generation times and acid production

Although previous work established that fast-growing *R. loti* strains can nodulate *L. subbiflorus* plants (Russell et al., 1990), our results show that most (87%) native rhizobia isolates nodulating *L. subbiflorus* were slow-growers. Out of the 15 isolates tested, only two of them, Ls5 and Ls552, showed generation times (3–3.5 h) similar to that of the fast-growing *R. loti* NZP2037



Table 1. Physiological and immunological characteristics of native isolates and commercial inoculant *R. loti* strains nodulating *L. subbiflorus*

Strain or isolate	Generation time (h) <sup>a</sup>	Antiserum <sup>b</sup>		
		Ls31	Ls7	Ls1B3
NZP2037	5.0 ± 0.9	0.02 ± 0.01	0.0	0.0
NZP2309	13.5 ± 0.4	0.13 ± 0.03	0.0	0.0
Ls31	11.5 ± 1.0	0.72 ± 0.15	0.0	0.0
Ls4	12.0 ± 0.8	0.09 ± 0.03	0.0	0.0
Ls11	12.2 ± 0.4	0.65 ± 0.08	0.0	0.0
Ls22	11.2 ± 1.1	0.78 ± 0.15	0.0	0.0
Ls42	12.4 ± 0.5	0.87 ± 0.09	0.0	0.0
Ls71	12.0 ± 1.1	0.80 ± 0.05	0.0	0.0
Ls81	12.1 ± 0.2	0.65 ± 0.15	0.0	0.0
Ls82	9.3 ± 1.0	0.77 ± 0.03	0.0	0.0
LsS3	13.0 ± 0.8	0.53 ± 0.04	0.0	0.0
Ls7	10.1 ± 1.0	0.09 ± 0.06	0.87 ± 0.02	0.0
Ls3	8.2 ± 1.0	0.10 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.0
Ls1B3	13.3 ± 1.2	0.0	0.0	0.74 ± 0.03
Ls1B4	11.0 ± 1.1	0.0	0.0	0.81 ± 0.02
Ls5	3.0 ± 0.9	0.10 ± 0.08	0.0	0.0
Ls552	3.4 ± 0.8	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>Values are means of four cultures ± S.D.

<sup>b</sup>ELISA test was performed with bacterial cells as antigens and the indicated isolates as primary antibodies. Values (OD<sub>450 nm</sub>) are means of four wells following subtraction of the negative control reading ± S.D.

(5 h) used as a reference strain (Table 1). The remaining 13 isolates, on the contrary, exhibited growth rates ranging from 8.2 to 13.3 h, which are close to that of the slow-growing reference strain NZP2309 (13.5 h) (Table 1).

Only the strain NZP2037 and the isolates Ls5 and Ls552 produced an acid reaction in YEM medium. This is consistent with previous results that indicate that fast-growing *R. loti* strains are able to acidify the growth medium (Monza et al., 1992b). All other isolates, as well as the slow-growing reference strain NZP2309 did not produce any significant changes in pH (data not shown).

#### Immunological cross-reactivity of strains and isolates

Eight out of the thirteen slow-growing isolates showed cross-reactivity with the antiserum raised against isolate Ls31 (Table 1). This indicates that they are closely related antigenically and, therefore, could be classified as belonging to the same serogroup. Among the remaining slow-growing isolates, on one hand, two of them, Ls3 and Ls7 and, on the other hand, isolates Ls1B3 and Ls1B4, can be grouped together according

to their cross-reactivity with Ls7 and Ls1B3 antiserum, respectively (Table 1). As indicated by the ELISA test, the slow-growing isolate Ls4 and the fast-growing Ls5 and Ls552, as well as the reference strains NZP2037 and NZP2309, did not share detectable antigenic determinants against the three antisera used (Table 1).

#### Carbon source utilization

No differences in the utilization of monosaccharides were observed among isolates (Table 2). All of them grew well with either D-glucose, D-galactose or D-xylose as the only C source. Similarly, all rhizobial cells tested were able to grow on mineral medium with either glycerol or mannitol (Table 2). Although it has been shown that fast- and slow-growing species of the Rhizobiaceae can use a variety of disaccharides (Stower, 1985), none of the *L. subbiflorus* isolates grew on lactose, raphinose or sucrose as the only C source. All of them, nevertheless, utilized maltose to support their growth. A clear-cut difference was observed in relation to the utilization of cellobiose and melibiose as the fast-growing isolates Ls5 and Ls552 utilized those compounds, whereas the slow-growing isolates did not

Table 2. Growth of native isolates and commercial inoculant *R. loti* strains nodulating *L. subbiflorus* on some carbon sources

Carbon source	Strain or isolate																
	NZP2037	NZP2309	Ls31	Ls4	Ls11	Ls22	Ls42	Ls71	Ls81	Ls82	LsS3	Ls7	Ls3	Ls1B3	Ls1B4	Ls5	Ls552
<i>Monosaccharides</i>																	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Polyols</i>																	
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Disaccharides</i>																	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raphinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Carboxylic acids</i>																	
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Piruvate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aromatic compounds (acid forms, except for phenol)</i>																	
Salicylic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ferulic	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Cumaric	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

(Table 2). Since disaccharide utilization has been used as a criterion to distinguish between *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains (Jordan, 1984; Martinez de Drets et al., 1974), and given the growth rate data presented in Table 1, isolates Ls5 and LS552 could be tentatively ascribed to *Rhizobium* species, whereas the remaining isolates could be considered as *Bradyrhizobium* species.

Among carboxylic acids, succinate allowed growth of both slow- and fast-growing isolates, whereas pyruvate and fumarate did not serve as C source for any of them. Citrate supported growth of the slow-growing isolates, and was not used by the fast-growing isolates Ls5 and Ls552 (Table 2). Although utilization of phenol or salicylic acid was not achieved by any of the isolates, they all grew well with ferulic acid. It is interesting to note that the slow-growers utilized cumaric acid, which could not be metabolized by the fast-

grows (Table 2). This is consistent with other reports that indicate that the ability to use aromatic compounds is widespread among slow-growing species of the Rhizobiaceae (Stower, 1985).

#### Whole cell protein profiles

Electrophoretic mobilities of whole cell proteins have been used not only to identify rhizobial strains (Fabiano and Arias, 1990; Roberts et al., 1980), but also to differentiate among isolates within the same serogroup (Broughton et al., 1987). One-dimensional SDS-PAGE revealed that seven out of the eight isolates included in serogroup represented by Ls31 showed a similar banding pattern (Fig. 1, lane A); only LsS3, within serogroup Ls31, had different protein profile to that of all other isolates in the serogroup (Fig. 1, lane B). Isolates Ls7 and Ls3 belonging to serogroup Ls7 differed

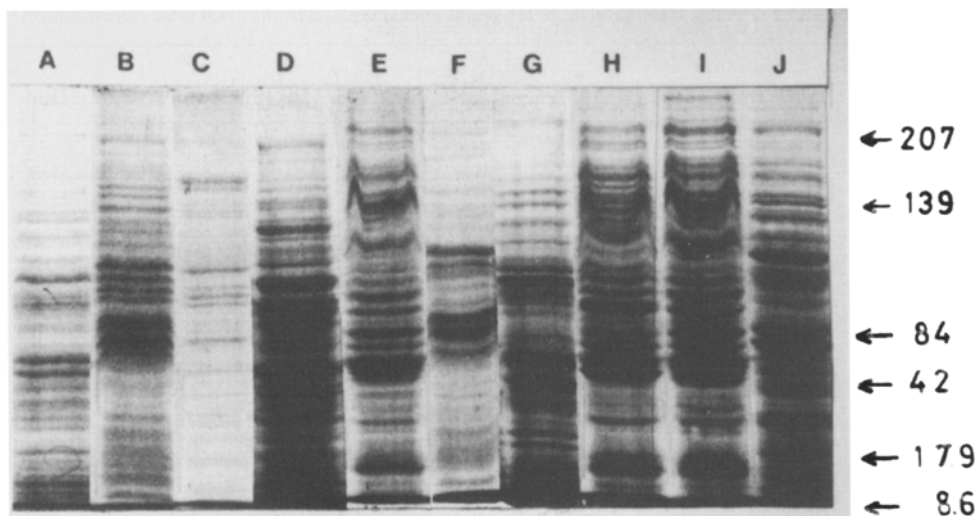


Figure 1. Whole cell proteins pattern (SDS-PAGE) of native isolates and commercial inoculant strains nodulating *L. subbiflorus*. Lanes A–H, isolates Ls31, LsS3, Ls7, LS3, Ls1B3, Ls5, Ls552, and Ls4, respectively; lane I, strain NZP2037, lane J, strain NZP2309. Numbers indicate in kDa the molecular masses of standard proteins: 207, myosin; 139,  $\beta$ -galactosidase; 84, bovine serum albumin; 42, carbonic anhydrase; 17.9, lysozyme; 8.6, aprotinin.

in protein profile (Fig. 1, lanes C and D, respectively), which also were clearly distinguishable from that of Ls31 and LsS3. In contrast to serogroup Ls7, isolates Ls1B3 and Ls1B4, both within serogroup Ls1B3, had an identical pattern of whole cell proteins (Fig. 1, lane E) which was clearly different from those of isolates in serogroups Ls31 and Ls7. The protein profiles of the fast-growing isolates Ls5 (Fig. 1, lane F) and Ls552 (Fig. 1, lane G), and that of the slow-growing Ls4 (Fig. 1, lane H) were different from one another as well as from those of isolates included in each serogroup. No similarities were found between electrophoretic mobilities of proteins from *L. subbiflorus* isolates and those of the proteins obtained from the commercial strains NZP2037 and NZP2309 (Fig. 1, lanes I and J, respectively). Results on both immunochemical assays and electrophoretic cell protein profiles indicate that only 8 out of the 13 slow-growing isolates could be considered as different strains of rhizobia. It is clear, however, that fast- and slow-growing isolates possess a different genetic background. These results contrast with those previously published (Monza et al., 1992b), that indicate that electrophoretic mobilities of cell proteins of each of the the 15 fast-growing isolates from root nodules of *L. corniculatus* were unique, suggesting that they represent different strains of rhizobia.

#### Plasmid content

Using the Eckhardt agarose gel procedure, no plasmid band could be seen in any of the isolates (Fig. 2, lane C). Simultaneous electrophoresis of *R. meliloti* GR4 (Fig. 2, lane A) and *R. loti* NZP2037 (Fig. 2, lane B), containing plasmids of known molecular weight, allowed visualization of the corresponding plasmid bands as previously described (Pankhurst et al., 1983; Toro and Olivares, 1986). These results contrast with those that indicate that most *R. loti* isolated from nodules of *L. corniculatus* harbour at least one plasmid (Monza et al., 1992b). Thus, although plasmid profiles have been reported as a convenient characteristic for grouping *R. meliloti* strains (Hartmann and Amarger, 1991), the absence of plasmids resolvable by electrophoresis did not allow the further identification of isolates from *L. subbiflorus*. The lack of plasmids in our isolates resembles that from other slow-growing rhizobia (bradyrhizobia), where the presence of plasmids is less frequent (Masterson et al., 1982).

#### Symbiotic effectiveness and physiological assays

Besides nodulating *L. subbiflorus*, all isolates used in this study formed effective nodules on *L. pedunculatus*, but did not nodulate either *L. corniculatus* or *L. tenuis*. Similarly, plants of *L. subbiflorus* were also effectively nodulated by rhizobial bacteria isolated from root

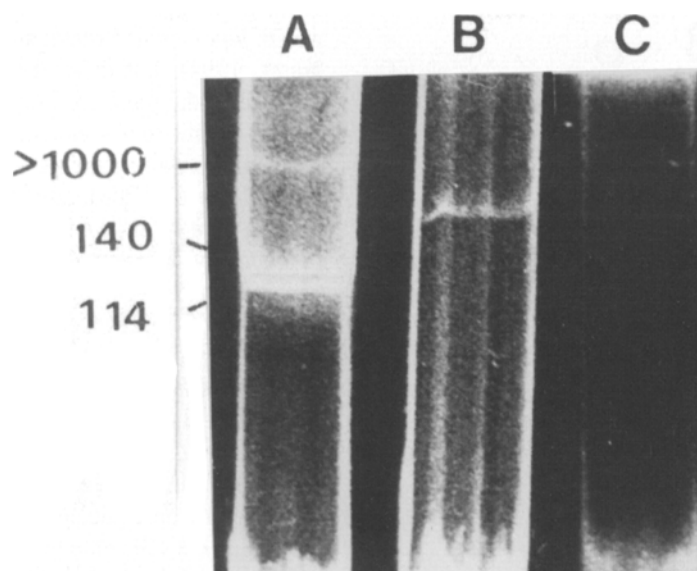


Figure 2. Plasmid profiles of lysates from *R. meliloti* GR4 (lane A), *R. loti* NZP2037 (lane B), and from any of the isolates tested (lane C). Numbers indicate in MDa the molecular size of plasmid bands (Pankhurst et al., 1983; Toro and Olivares, 1986).

Table 3. Symbiotic properties of native isolates and commercial inoculant *R. loti* strains nodulating *L. subbiflorus*

Strain or isolate	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Relative efficiency <sup>b</sup>	Plant dry weight (mg)
	reduction <sup>a</sup>	production <sup>a</sup>		
	(μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> or H <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> nfw) <sup>c</sup>			
NZP2037	ND <sup>d</sup>	ND	ND	10.8 ± 1.4
NZP2309	ND	ND	ND	9.8 ± 1.1
Ls31	13.8 ± 3.1	4.8 ± 1.0	0.65	12.0 ± 2.1
Ls4	10.0 ± 2.6	3.2 ± 0.2	0.68	11.2 ± 0.5
Ls11	10.6 ± 1.6	4.0 ± 0.6	0.62	14.2 ± 1.8
Ls22	15.2 ± 3.9	5.2 ± 0.9	0.66	10.3 ± 2.0
Ls42	12.0 ± 3.6	3.9 ± 0.6	0.68	9.8 ± 1.6
Ls71	16.9 ± 4.0	4.4 ± 1.4	0.74	11.0 ± 1.7
Ls81	9.9 ± 0.9	2.7 ± 0.3	0.73	9.9 ± 2.8
Ls82	9.6 ± 1.6	3.6 ± 0.9	0.63	11.7 ± 3.5
LsS3	11.3 ± 2.5	2.3 ± 0.6	0.80	12.7 ± 1.5
Ls7	16.6 ± 4.7	3.0 ± 0.3	0.82	16.0 ± 2.8
Ls3	9.2 ± 0.6	3.4 ± 1.4	0.63	13.0 ± 1.1
Ls1B3	9.6 ± 1.0	3.4 ± 0.6	0.65	10.5 ± 3.1
Ls1B4	15.4 ± 1.9	3.1 ± 0.8	0.80	15.0 ± 2.2
Ls5	15.0 ± 1.9	4.1 ± 1.2	0.73	10.4 ± 0.9
Ls552	10.2 ± 2.8	3.8 ± 0.8	0.63	10.2 ± 2.4

<sup>a</sup> Values are means of five replicates ± s.d.

<sup>b</sup> Relative efficiency was calculated as  $1 - H_2 / C_2H_4$ .

<sup>c</sup> nfw = nodule fresh weight.

<sup>d</sup> ND = not determined.

nodules of *L. pedunculatus*. However, isolates from both *L. tenuis* and *L. corniculatus* formed ineffective pseudonodules of vivid red colour on *L. subbiflorus*.

This type of tumour-like structure, which contains no *Rhizobium*-infected plant cells, has been previously

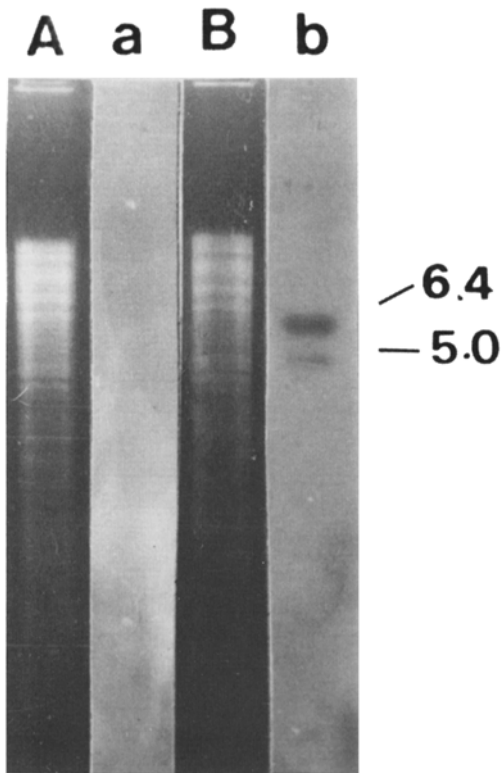


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-restricted total DNA from isolate Ls11 (lane A) and *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (lane B). Lanes a and b show the autoradiograms of dry gels A and B, respectively, after hybridization with the *Sal*I DNA fragment containing *hup* specific genes from *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Since this *Sal*I fragment contains an internal *Eco*RI site, two hybridizing fragments of 5 and 6.4 Kb, respectively, appear for the UPM791 *Eco*RI digest in lane b (Leyva et al., 1987).

described for *L. pedunculatus* (Pankhurst et al., 1979) and *L. subbiflorus* (Monza et al., 1992a).

Only the inoculation of isolate Ls7 resulted in significantly ( $p \leq 0.05$ ) higher plant dry weight than inoculation with the remaining isolates (Table 3).  $H_2$  evolution in air and  $C_2H_2$  reduction of root nodules from *L. subbiflorus* plants in symbiosis with each single isolate are indicated in Table 3. Given the criticisms on the traditional acetylene reduction assay (Minchin et al., 1994; Vessey, 1994), the values in Table 3 are intended for comparative purposes only, to show relative differences in nitrogenase activities of the different isolates.

Bacteria forming nodules on legume roots may synthesise uptake hydrogenase which recycles the  $H_2$  evolved by nitrogenase in the nodules (Evans et al., 1987; Maier, 1986), and contribute to the overall efficiency of the  $N_2$  fixation process (Evans et al., 1988). These bacteria include *R. leguminosarum* bv. *viciae*

and *B. japonicum* (Brito et al., 1994; Vignais and Toussaint, 1994), but there are no data concerning the absence or the presence of genetic determinants (*hup* genes) in rhizobia nodulating *Lotus* sp. DNA-DNA hybridization experiments revealed that none of the *L. subbiflorus* isolates, as exemplified by isolate Ls11 (Fig. 3, lane a), showed DNA sequences homologous to the *hup* probe containing the hydrogenase structural genes from *R. leguminosarum* bv. *viciae*. UPM791. The possibility, however, that any of the isolates may contain *hup* genes cannot be ruled out as more than one type of *hup* sequence may occur within rhizobia (Murillo et al., 1989).

In conclusion, our results, based on plant specificity, doubling time, carbon source utilization and acid production indicate that native isolates present in Uruguayan soils able to nodulate *L. subbiflorus* are predominantly slow-growers. Among them, eight different strains were characterized after immunochemical assays and protein profiles. Analysis of plasmid content of the isolates and on the presence of genes coding for hydrogenase activity did not further allow distinction among isolates. Although more information about those native isolates is required, they may be a useful source of strains to resolve practical problems in field inoculation of *L. subbiflorus* pastures.

#### Acknowledgements

We thank A Baraibar, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, and C Labandera, Laboratorio de Microbiología, MGAP, Montevideo, Uruguay, for providing *L. subbiflorus* isolates, O Borsani for his help with ELISA tests and J Palacios for providing *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791. Financial assistance was provided by Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica-Banco Interamericano de Desarrollo, Grant No 134, UNESCO-Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo and Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Grant No. AGF92-0188.

#### References

- Arias A, Cerveñansky C, Gardiol A and Martínez-Drets G 1979 Phosphoglucose isomerase mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 137, 409-414.
- Asuaga A 1994 *Lotus subbiflorus* cv. El Rincón, a new alternative for extensive improvements of natural pastures. *In Proceedings of*

- the First International *Lotus* Symposium. Eds. P R Beuselinck and A R Craig. pp 147–150. St. Louis, Missouri, USA.
- Baraibar A, Frioni L, Guedes ME, Pagliano D, Viera S and Casartelli R 1988 Relevamiento y caracterización de la población de *Rhizobium loti* en suelos del Uruguay. In Proceedings of the XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ed. H Urzúa. pp 46–51. Santiago, Chile.
- Brito B, Palacios J M, Hidalgo E, Imperial J and Ruiz-Argüeso T 1994 Nickel availability to pea (*Pisum sativum*) plants limits hydrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids by affecting the processing of the hydrogenase structural subunits. *J. Bacteriol.* 176, 5297–5303.
- Broughton W J, Samrey U and Stanley J 1987 Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: Symbiotic plasmid transfer in the *Medicago sativa* rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 40, 251–255.
- Corbin D, Ditta G and Helinski D R 1982 Clustering of nitrogen fixation *nif* genes in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 149, 221–228.
- Eckhardt T 1978 A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584–588.
- Evans H J, Harker A R, Papen H, Russell A, Hanus F J and Zuber M 1987 Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 335–361.
- Evans H J, Russell S A, Hanus F J and Ruiz-Argüeso T 1988 The importance of hydrogen recycling in nitrogen fixation by legumes. In *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Ed. R J Summerfield. pp 777–791. Kluwer Academic Publications, Boston, USA.
- Fabiano E and Arias A 1990 Identification of inoculants strains and naturalized population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 127–133.
- Hartmann A and Amarger N 1991 Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing. *Can. J. Microbiol.* 37, 600–608.
- Jarvis B D, Pankhurst C E and Patel J J 1982 *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 32, 378–380.
- Jordan D C 1982 Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. nov., a genus of slow-growing root nodules bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 32, 136–139.
- Jordan D C 1984 Gram-negative aerobic rods and cocci, Family III. *Rhizobiaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. N Krieg and J G Holt. pp 234–244. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Laemmli U K 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leyva A, Palacios J M, Mozo T and Ruiz-Argüeso T 1987 Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 169, 4929–4934.
- Maier R J 1986 Biochemistry, regulation and genetics of hydrogen oxidation in *Rhizobium*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 3, 17–38.
- Martinez de Drets G, Arias A and Rovira de Cutinella M 1974 Fast- and slow-growing rhizobia: differences in sucrose utilization and invertase activity. *Can. J. Microbiol.* 20, 605–609.
- Masterson R, Russi P R and Atherly A G 1982 Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 152, 938–931.
- Michin F R, Witty J F and Mytton L 1994 Reply to "Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defence of the acetylene reduction assay" by J K Vessey. *Plant and Soil* 158, 163–167.
- Monza J, De Felipe R and Bedmar E J 1992a Nódulos *Fix*-formados por rhizobios de crecimiento rápido en *Lotus subbiflorus*. In *Resúmenes de la XVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*: p. 42. Sta. Rosa, La Pampa, Argentina.
- Monza J, Fabiano E and Arias A 1992b Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 241–247.
- Murillo J, Villa A, Chamber M and Ruiz-Argüeso T 1989 Occurrence of H<sub>2</sub>-uptake hydrogenases in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) and their expression in nodules of *Lupinus* spp. and *Ornithopus compressus*. *Plant Physiol.* 89, 78–85.
- Pankhurst C E 1977 Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast- and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can. J. Microbiol.* 23, 1026–1033.
- Pankhurst C E, Craig A S and Jones W T 1979 Effectiveness of *Lotus* root nodules: I. Morphology and flavolan content of nodules formed on *Lotus pedunculatus* by fast-growing *Lotus* rhizobia. *J. Exp. Bot.* 30, 1085–1093.
- Pankhurst C E, Broughton W J and Wieneke U 1983 Transfer of an indigenous plasmid of *Rhizobium loti* to other rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2535–2543.
- Rigaud J and Puppo A 1975 Indole-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88, 223–228.
- Roberst G P, Leps W T, Silver L E and Brill W J 1980 Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 114–422.
- Rosemberg C, Boistard P, Denarié J and Casse-Delbart F 1981 Genes controlling early and late functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 184, 326–333.
- Russel H, Pastorini D, Labandera C and Curbelo S 1990 Comportamiento simbiótico de *Lotus subbiflorus* spp. *subbiflorus*. In *Seminario de Campo Natural*. Ed. Hemisferio Sur. pp 255–262. Montevideo, Uruguay.
- Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Schubert K R and Evans H J 1976 Hydrogen evolution – a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1207–1211.
- Stower M D 1985 Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 89–108.
- Toro N and Olivares J 1986 Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* 202, 331–335.
- Vessey J K 1994 Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* 158, 151–162.
- Vignais P M and Toussaint B 1994 Molecular biology of membrane-bound H<sub>2</sub> uptake hydrogenases. *Arch. Microbiol.* 161, 1–10.
- Vincent J M 1970 A manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. I.B.P. Handbook No. 15. Blackwell, Oxford, UK.
- Wright S F, Foster G J and Bennett O L 1986 Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 119–123.

Section editor: R O D Dixon

## Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp.

Jorge Monza<sup>1,\*</sup>, Pilar Irisarri<sup>1</sup>, Pedro Díaz<sup>1</sup>, Ma. Jesús Delgado<sup>2</sup>, Socorro Mesa<sup>3</sup> and Eulogio J. Bedmar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Avenida Garzón 780, 12900, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P.O. Box 419, 18080, Granada, Spain; <sup>3</sup>Institut für Mikrobiologie, ETH-Zentrum/LFV, Schmelzbergstrasse 7, CH, 8092, Zurich, Switzerland; \*Author for correspondence (e-mail: jmonza@fagro.edu.uy; phone: + 59823540229; fax: + 59823590436)

Accepted in revised form 21 November 2005

**Key words:** 16S rDNA sequentiation, Denitrification genes, Gene probes, Lotus rhizobia, Nitrous oxide accumulation

### Abstract

Ten rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. have been characterized by their ability to denitrify. Out of the 10 strains, the five slow-growing isolates grew well under oxygen-limiting conditions with nitrate as a sole nitrogen source, and accumulated nitrous oxide in the growth medium when acetylene was used to inhibit nitrous oxide reductase activity. All five strains contained DNA homologous to the *Bradyrhizobium japonicum nirK*, *norBDQ* and *nosZ* genes. In contrast, fast-growing lotus rhizobia were incapable of growing under nitrate-respiring conditions, and did not accumulate nitrous oxide in the growth medium. DNA from each of the five fast-growing strains showed a hybridization band with the *B. japonicum nirK* gene but not with *norBDQ* and *nosZ* genes. Partial 16S rDNA gene sequencing revealed that fast-growing strains could be identified as *Mesorhizobium loti* species and the slow-growers as *Bradyrhizobium* sp.

### Introduction

Denitrification refers to the reduction of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) or nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) to dinitrogen gas ( $\text{N}_2$ ) via intermediates nitric oxide (NO) and nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) when oxygen concentrations are limiting. Nitrate is reduced to nitrite by either membrane-bound (Nar) or periplasmic (Nap) nitrate reductase, and nitrite reductase (Nir) catalyses the reduction of nitrite to nitric oxide. NO is further reduced to nitrous oxide by nitric oxide reductase (Nor) and, finally,  $\text{N}_2\text{O}$  is converted to  $\text{N}_2$  by the nitrous oxide reductase enzyme (Nos).

The respiratory electron transfer from reducing equivalents to N-oxides is coupled to proton translocation and energy conservation, which permit cells to grow under oxygen-limited conditions. Although the denitrification process is initiated by nitrate reduction, this reaction is not unique to denitrification since it also occurs in ammonification and assimilatory nitrate reduction. Thus, it is considered that the defining reaction in denitrification is the reduction of nitrite to the first gaseous intermediate, NO (Mesa et al. 2004). Comprehensive reviews covering the physiology, biochemistry and genetics of denitrification have

been published elsewhere (Zumft 1997; Richardson and Watmough 1999; Hendriks et al. 2000).

Bacteria of the genera *Allorhizobium*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phyllospirochaeta*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium*, collectively referred to as rhizobia, are members of the order Rhizobiales with the unique ability to establish N<sub>2</sub>-fixing symbiosis with leguminous plants (Sawada et al. 2003). Denitrification among rhizobia is rare, and most species do not contain the whole set of denitrification genes. *Pseudomonas* sp. G-179 (actually *R. galegae*) (Bedzyk et al. 1999) has been shown to contain Nap, Nor and Cu-Nir (Ye et al. 1993), and *A. brasilense* harbours Nap and a cytochrome *cd*<sub>1</sub>-containing Nir (Steenhoudt et al. 2001); *R. sulae* (formerly *R. hedisary*) only expresses Nir (Toffanin et al. 1996), and the genetic determinants for expression of Nir and Nor are present in *R. etli* (Gómez-Hernández et al. unpublished work). Although both *S. meliloti* and *B. japonicum* contain the *nap*, *nir*, *nor*, and *nos* genes (see <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>), only *B. japonicum* grows under oxygen-limiting conditions with nitrate as the sole source of N (for a review see Bedmar et al. 2005). Denitrification genes are not present either in the complete genome sequence of *M. loti* strain MAFF303099 or in the symbiotic island of *M. loti* strain R7A (see <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>).

Based on colony type and growth rates, isolates from nodules of *Lotus* sp. were first separated into two groups corresponding to slow- and fast-growing strains (Bonish et al. 1991). Similar results were found for rhizobial isolates from *L. corniculatus* and *L. subbiflorus* (Monza et al. 1992; Irisarri et al. 1996) but its denitrification ability was not studied. NO and N<sub>2</sub>O fluxes between soil and atmosphere result from complex microbial activities which proceed simultaneously in soils and so it seems relevant to study the ability of these bacteria to denitrify. The present work is aimed to study denitrification in lotus rhizobia, bacteria that nodulate different *Lotus* species widely cultivated as pasture legumes in South America.

Using *B. japonicum* denitrification genes as a probe, the presence of homologous genes has been studied in 10 fast- and slow-growing lotus rhizobia. We also report on the ability of each isolate to denitrify and on the genotypic identification of the strains by 16S rDNA partial sequencing.

## Materials and methods

### *Bacterial strains and growth conditions*

Fast-growing lotus rhizobia Sul1, T1 and Y3 isolated from *Lotus corniculatus* (Monza et al. 1992), B816 (strain U226 in the Uruguayan Type Rhizobial Collection), obtained from the Department of Microbiology, University of New South Wales, Kensington, Australia, and NZP2037 (strain U261 in the Uruguayan Type Rhizobial Collection) received from the Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston South, New Zealand, have been used in this study. Slow-growing strains IB3, Ls4, Ls31, Ls82, isolated from *L. subbiflorus* (Irisarri et al. 1996) and NZP2309 (strain U416 in the Uruguayan Type Rhizobial Collection), obtained from Department of Scientific and Industrial Research, Palmerston South, New Zealand, have also been used. Yeast extract-mannitol (YEM) medium (Vincent 1974) was used for routine aerobic cultures. For growth under denitrifying conditions, cells were kept at 28 °C for 7 d in YEM medium supplemented or not with 10 mM KNO<sub>3</sub> (YEMN) in rubber-stoppered serum bottles. Microaerobic conditions were achieved by aseptically evacuating and backfilling with N<sub>2</sub>. Optical density readings were measured at 600 nm every 24 h. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA) was maintained at 30 °C in YEM medium, and cells of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  were cultured at 37 °C in LB medium (Miller 1972).

### *Gene probes*

Plasmid isolations, restriction enzyme digestions, agarose gel electrophoresis and Southern transfers onto nylon membranes were performed according to standard protocols (Sambrook et al. 1989). The *nir* probe used was the 3-kb *Hind*III fragment from pJNIR61 which contains the *B. japonicum* USDA110 *nirK* gene (Velasco et al. 2001). As a *nor* probe, the *Eco*RI 4.1-kb fragment from pJNOR41 carrying the *norBQD* genes from *B. japonicum* USDA110 was used (Mesa et al. 2002). A 6.5 *Eco*RV/*Cla*I fragment containing *Ralstonia eutropha* *nor* genes (Cramm et al. 1997; Pohlmann et al. 2000) was also used as a *nor* probe. Cleavage of plasmid pCLE201 with *Eco*RI gave an 1.8-kb



fragment containing the *B. japonicum* USDA110 C-terminus of *nosZ* and the N-terminus of *nosD* (Velasco et al. 2004) which was used as a *nos* probe. Genomic DNA of *M. loti* and *B. sp. (Lotus)* strains for Southern blot analysis was restricted by HindIII, EcoRV and EcoRI for *nir*, *nor* and *nos* probes, respectively. Hybridizations were performed with digoxigenin-dUTP-labeled probes (Roche), and the chemiluminescence method was applied to detect hybridization bands.

#### *DNA manipulation and determination of rRNA gene sequences*

Bacterial genomic DNA prepared from liquid cultures harvested at late exponential phase using Quantum prep aquapure genomic DNA purification kits (Bio-Rad) was used in PCRs with 16S rDNA primers 41-fD1 and 1488-rD1 (Weisburg et al. 1991). Reaction mixes (50 µl) and cycling parameters used for amplification of 16S rDNA were as described earlier (Zurdo-Piñeiro et al. 2004). PCR products were purified with Microcon PCR centrifugal filter devices (Millipore). The sequencing reactions were analysed in a DNA sequencer (model 373 Strecth and dye primers from Applied Biosystems). Computer-assisted DNA and protein sequence analyses were performed by using the Genetics Computer Groups (University of Wisconsin) software packages. Homology searches were performed by using the National Center for Biotechnology Information BLAST network server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### *Physiological assays*

For N<sub>2</sub>O determination, 100 ml of aerobically grown cells (approx. 10<sup>8</sup> cells/ml) were collected by centrifugation (8000 × *g* for 10 min at 4 °C), washed with YEM medium, and finally resuspended in 1 ml of the same medium. Aliquots (200 µl) were used to inoculate 30 ml of microaerobic YEMN medium. A set of tubes was injected with acetylene (5%) to inhibit nitrous oxide reductase (Yoshinari and Knowles 1976), and then incubated for 7 d at 28 °C in a rotary shaker at 120 rpm. A Shimadzu model 14B gas chromatograph equipped with an electron capture detector,

and a front-flush and back-flush system to prevent N<sub>2</sub>O interferences from O<sub>2</sub> and acetylene, was operated with a Porapak Q (80–100 mesh) column (250 × 0.3 cm). N<sub>2</sub> at 60 ml/min served as a carrier gas. Oven, injector and detector temperature were 70, 90 and 300 °C, respectively. Gas samples (1000 µl) were withdrawn from the headspace and assayed for N<sub>2</sub>O production. Concentrations of N<sub>2</sub>O in each sample were calculated from standards of pure nitrous oxide according to Christensen and Tiedje (1988). Oxygen concentration within the tubes was lower than 1.5% as determined by gas chromatography using a thermal conductivity detector (data not shown). Protein concentration was estimated according to Bradford (1976) after centrifuging the cells and boiling the pellet with 0.1 N NaOH for 10 min. Bovine serum albumin was used as the standard.

#### **Results and discussion**

Strains Y3, T1, Sul1, U226 and U261 have a generation time ranging from 4 to 8 h (Monza et al. 1992) and are hereafter referred as to fast-growing lotus rhizobia. Strains U416, Ls31, Ls82, IB3, and Ls4 have a doubling time varying from 9 to 13 h (Irisarri et al. 1996) and will be hereafter considered as slow-growing lotus rhizobia. Whereas the fast-growing lotus rhizobia effectively nodulate *L. corniculatus* and *L. tenuis*, the slow-growing strains typically form nodules on *L. subbiflorus* and *L. uliginosus*. Except for strain U261, which effectively nodulate *L. subbiflorus* and *L. uliginosus*, fast-growing strains form tumour-like structures when inoculated to *L. subbiflorus* (Monza et al. 1992). An account of the physiological, biochemical and some genetic characteristics of lotus rhizobia used in this work has been previously published (Monza et al. 1992; Irisarri et al. 1996; Santamaria et al. 1999).

After growth for 7 d under oxygen-limiting conditions in YEMN medium, optical density of the cultures from slow-growing strains U416, Ls4, Ls31, Ls82 and IB3 increased from 0.05 to about 0.4. Only slight increases in optical density were observed when cultured in YEM medium, most probably due to the presence of oxygen in the medium. These results suggest that slow-growing strains used nitrate both for ATP generation and biosynthetic purposes. Moreover, nitrate

consumed by those strains was always higher than 30%, a feature considered as a characteristic for denitrification to occur (Zablotowicz et al. 1978). In contrast, optical density of cultures from the fast-growing strains Y3, T1, Sul1 and U261 did not significantly increase during growth under microaerobic conditions with nitrate, and did not remove nitrate from the medium at amounts higher than 10%. Interestingly, although cells of strain U226 repeatedly consumed between 25 and 30% of the nitrate present in the culture medium, optical density of the cultures never reached that of 0.15 (data not shown).

Because acetylene inhibits nitrous oxide reductase, determining the nitrous oxide produced with

and without acetylene has been used as a technique to study potential denitrification capability (Yoshinari and Knowles 1976). Whereas nitrous oxide was detected after incubation with acetylene of each slow-growing-strain under denitrifying conditions, concentration of  $N_2O$  produced by cultures of strains U416, Ls31 and IB3 incubated without acetylene was lower than  $50 \mu\text{mol } N_2O/\text{mg}$  protein, the calculated gas chromatograph detection limit (Table 1). Nitrous oxide also accumulated in the culture medium of the slow-growers Ls4 and Ls82 in absence of acetylene, although to a lesser extent than during incubation with acetylene (Table 1). Even though these strains seem to possess the *nosZ* gene, its expression is low in our

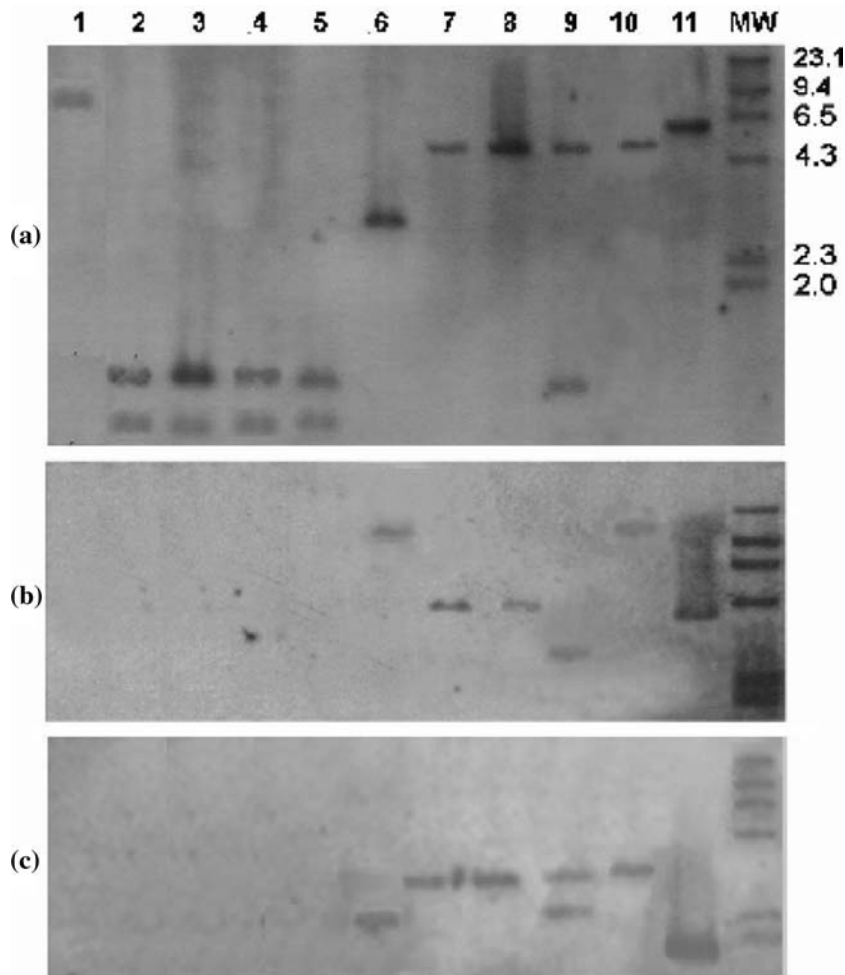


Figure 1. Hybridization of different enzymatically-restricted DNAs from lotus rhizobia. Lanes: 1, Y3; 2, T1; 3, Sul1; 4, U226; 5, U261; 6, U416; 7, Ls31; 8, Ls82; 9, IB3; 10, Ls4; 11, *B. japonicum* USDA110 total DNA; 12, MW, molecular weight marker II (Roche). Numbers indicate in kb the size of the hybridization bands.

Table 1. Nitrous oxide accumulation by lotus rhizobia. Cells were grown in YEMN under oxygen-limiting conditions for 7 d. Values, expressed as  $\mu\text{mol N}_2\text{O}$  produced  $(\text{mg protein})^{-1}$ , are averages of the results of at four replicates  $\pm$  standard error of the mean.

Strain	Nitrous oxide	
	+ Acetylene	- Acetylene
U416	624 $\pm$ 117	$\leq$ 50
IB3	136 $\pm$ 64	$\leq$ 50
Ls4	208 $\pm$ 12	110 $\pm$ 6
Ls31	593 $\pm$ 67	$\leq$ 50
Ls82	386 $\pm$ 6	250 $\pm$ 23
U226	$\leq$ 50	$\leq$ 50
U261	$\leq$ 50	$\leq$ 50
T1	$\leq$ 50	$\leq$ 50
Y3	$\leq$ 50	$\leq$ 50
Sull	$\leq$ 50	$\leq$ 50

assay conditions. Levels of  $\text{N}_2\text{O}$  in cultures of the fast-growing strains were always below the gas chromatograph detection limit (Table 1).

Southern hybridization to locate the presence of denitrification genes in total DNA from lotus rhizobia revealed that all the 10 strains contained DNA showing homology with the *B. japonicum nirK* gene used as a probe (Figure 1a). In T1, Sull, U226 and U261 *M. loti* strains two bands were visible for the *nirK* probe hybridization (Figure 1a), which suggests a difference between these strains and Y3. The *B. japonicum norBQD* genes also hybridized to DNA from each slow-growing strain, whereas no hybridization band was observed in DNA from any of the fast-growing strains (Figure 1b). No hybridization signal was detected when *nor* genes from *R. eutropha* were used as a DNA probe. When the *B. japonicum nosZ* gene was used as a probe, only the slow-growers Ls31, Ls82, IB3, Ls4 and U416 showed hybridization band (Figure 1c) and reduced nitrous oxide (Table 1).

The 16s rDNA from each lotus rhizobia was sequenced nearly to completion by using the fD1 and rD1 primers. Analysis of the nucleotide sequence identified the fast-growing strains as *Mesorhizobium loti*, and the slow-growing as *Bradyrhizobium* sp. Taken together, our results indicate that slow-growing rhizobia isolated from *Lotus* sp. can be considered as true denitrifiers as they carry out the complete denitrification pathway. Out of the five fast-growing strains, all of them contained a *nirK* gene, and strain U226

also possessed an homolog of the *B. japonicum nosZ* gene. These results contrast with those that indicate that no denitrification gene is present in the complete genome sequence of *M. loti* strain MAFF303099 or in the symbiotic island of *M. loti* strain R7A (see <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>).

## Acknowledgements

This work was funded by grants BMC2002-04126-C03-02 and FIT-050000-2001-30 from Dirección General de Investigación to E.J. Bedmar. The support of Junta de Andalucía (PAI/CVI-275) and Convenio de Cooperación CSIC (Spain) – Universidad de la República (Uruguay) is also acknowledged.

## References

- Bedmar E.J., Robles E.F. and Delgado M.J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 145-148.
- Bedzyk L., Wang T. and Ye R.W. 1999. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* 181: 2802-2806.
- Bonish P.M., Steel K.W. and Neville F.J. 1991. Denitrifying and symbiotic characteristics of Lotus-rhizobia from two New Zealand soils. *New Zealand J. Agri. Res.* 34: 221-226.
- Bradford M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Christensen S. and Tiedje J.M. 1988. Sub-parts-per-billion nitrate method: use of an  $\text{N}_2\text{O}$  – producing denitrifier to convert  $\text{NO}_3^-$  or  $^{15}\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2\text{O}$ . *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1409-1413.
- Cramm R., Siddiqui R.A. and Friedrich B. 1997. Two iso-functional nitric oxide reductases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 179: 6769-6777.
- Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., Urbani A., Geminhardt S. and Saraste M. 2000. Nitric oxide reductase in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 266-273.
- Irisarri P., Milnitsky F., Monza J. and Bedmar E.J. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant Soil* 180: 39-47.
- Mesa S., Alché J.D., Bedmar E.J. and Delgado M.J. 2004. Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plant.* 120: 205-211.
- Mesa S., Velasco L., Manzanera M.E., Delgado M.J. and Bedmar E.J. 2002. Characterization of the *nor CBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* 148: 3553-3560.

- Miller J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Monza J., Fabiano E. and Arias A. 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. Soil Biol. Biochem. 24: 241-247.
- Pohlmann A., Cramm R., Schmelz K. and Friedrich B. 2000. A novel NO-responding regulator controls the reduction of nitric oxide in *Ralstonia eutropha*. Mol. Microbiol. 38: 626-638.
- Richardson D.J. and Watmough N.J. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 207-219.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santamaria M., Agius F., Monza J., Gutierrez-Navarro A.M. and Corzo J. 1999. Comparative performance of enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction and lipopolysaccharide electrophoresis for the identification of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). FEMS Microbiol. Ecol. 28: 163-168.
- Sawada H., Kuykendall L.D. and Young J.M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J. Gen. Appl. Microbiol. 49: 155-179.
- Steenhoudt O., Keijers V., Okon Y. and Vanderleyden J. 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. Arch. Microbiol. 175: 344-352.
- Toffanin A., Wu Q, Maskus M., Casella S., Abruña H.D. and Shapleigh J.P. 1996. Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium hedysari* strain HCNT1. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4019-4025.
- Velasco L., Mesa S., Delgado M.J. and Bedmar E.J. 2001. Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. Biochim Biophys Acta 1521: 130-134.
- Velasco L., Mesa S., Xu C.A., Delgado M.J. and Bedmar E.J. 2004. Molecular characterization of *nosRZDFYLYX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. Antonie van Leeuwenhoek 85: 229-235.
- Vincent J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: Quispel A. (ed.), The Biology of Nitrogen Fixation, American Elsevier Publishing Co., New York, NY, pp. 265-341.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. 1991. 16S ribosomal amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Ye R.W., Fries M.R., Bezborodnikov S.G., Averill S.A. and Tidje T.M. 1993. Characterization of structural gene encoding a copper-containing nitrate reductase and homology of this gene to DNA of the other denitrifiers. Appl. Environ. Microbiol. 59: 250-254.
- Yoshinari T. and Knowles R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 69: 705-710.
- Zablotowicz R.M., Eskew D.L. and Focht D.D. 1978. Denitrification in rhizobia. Can. J. Microbiol. 24: 757-760.
- Zumft W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616.
- Zurdo-Piñeiro J.L., Velázquez E., Lorite M.J., Brelles-Mariño G., Schröder E.C., Bedmar E.J., Mateos P.F. and Martínez-Molina E. 2004. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. Syst. Appl. Microbiol. 27: 469-477.



## Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay

Mariana Sotelo<sup>a,1</sup>, Pilar Irisarri<sup>a,1</sup>, María J. Lorite<sup>c</sup>, Esteban Casaretto<sup>a</sup>, Mónica Rebuffo<sup>b</sup>, Juan Sanjuán<sup>c</sup>, Jorge Monza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Av. Garzón 809, 12900 Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay

<sup>c</sup> Depto. de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Prof. Alvareda N 1, Granada E-18008, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 October 2010

Received in revised form 12 May 2011

Accepted 13 May 2011

#### Keywords:

Mesorhizobium

atpD

16S rRNA

ITS

nodC

nifH

### ABSTRACT

Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in geographical regions with different rainfall regimes in northern and southern Uruguay, was estimated using 168 root nodule isolates. ERIC-PCR analysis revealed no correlation between observed fingerprints and the geographical origin of isolates. Despite the commercial strain U510 has been used for decades to inoculate *L. corniculatus*, none of the isolates corresponded to this strain. Phylogenetic analyses using 16S rRNA and *atpD* genes, and ITS sequences clustered all the isolates within genus *Mesorhizobium*. A great majority of the isolates likely belong to the species *M. huakuii*, as does the commercial strain U510. The remaining isolates were closely related to either *M. septentrionale* or *M. caraganae*. Although no *M. loti*-like bacteria were identified, all isolates carried symbiotic genes closely related to *M. loti* and other narrow host range *Lotus* rhizobia. A significant portion of the Uruguayan isolates were as efficient as the reference strain U510 in symbiosis with *L. corniculatus*. A few of the isolates were also capable of nitrogen fixation in symbiosis with *L. uliginosus*, albeit with lower efficiency than reference strains. Our results indicate that rhizobia nodulating *L. corniculatus* in Uruguay are genetically and phenotypically diverse, and that the commercial strain U510 is probably not adapted to survive the Uruguayan edaphoclimatic conditions.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Extensive cattle rearing in northern and central Uruguay depends mainly on the availability of natural communities of grasses. A recommended practice to provide nitrogen to natural swards and to increase the quality and quantity of grasses is the introduction of legumes with their associated rhizobia (Rebuffo et al., 2006). In contrast, intensive dairy cattle feeding and winter beef fattening in the southwest are based on the use of highly productive cultivated pastures of perennial legumes. Although permanent pastures in Uruguay are composed mostly of mixtures of a number of legumes and grasses, the most relevant legume species is *Lotus corniculatus* cv. San Gabriel (DIEA, 2007). *L. corniculatus* is known to establish nitrogen-fixing symbiotic associations with several species of the genus *Mesorhizobium*.

Legume inoculants are usually based on selected highly efficient rhizobia and evaluated in particular environments. However, inoculant's success is frequently limited by the presence of native soil rhizobia. This is often due to the superior competitive ability of native strains, which occupy the majority of the nodules under field conditions because of their large population sizes, their distribution throughout the soil profile or their better adaptation to the local soil environment (Estrella et al., 2009).

Uruguay has adopted inoculation practice since 1972 in order to increase forage production. *L. corniculatus* (bird's foot trefoil) has been inoculated with only one strain of *M. loti* (U510) introduced from Australia (Synonyms: strains U226, B816; Labandera et al., 1982). As far as we know this strain has never been characterized at a genetic or molecular level. Several studies (Monza et al., 1992; Agius et al., 1997; Baraibar et al., 1999) suggested that there could be considerable strain diversity within natural or naturalized rhizobial populations inducing nodules on *L. corniculatus* in Uruguay. However, detailed information regarding taxonomic and physiological features of indigenous rhizobial strains is not available. Pressured by the current expansion of intensive crop systems in Uruguay, pasture areas have been relegated to marginal, low fertility soils in the northern region. These soils are also

\* Corresponding author.

E-mail address: [jmonza@fagro.edu.uy](mailto:jmonza@fagro.edu.uy) (J. Monza).

<sup>1</sup> First two authors equally contributed to this work.

affected by periodic droughts which limit plant growth and particularly nitrogen fixation, since the legume-*Rhizobium* symbiosis is known to be more sensitive to environmental stresses, especially drought, than are the individual partners (Werner, 1992). This fact together with the increasingly demand of farmers for commercial inoculants with more consistent field performances, make relevant to explore potential genotypic and phenotypic variation among rhizobia that nodulate this legume and to study whether rhizobial diversity is affected by inoculation or by stressful conditions.

The aim of this study was to characterize the diversity and effectiveness of rhizobia isolated from nodules of *L. corniculatus* growing in two geographical regions with different levels of rainfall, available water content (AWC) and inoculation histories, in order to respond to the actual demand for better inoculant strains that can tolerate the environmental constraints prevalent in the new areas where cattle rearing is being relegated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of nodule bacteria

A time-series analysis of available water content (AWC) in soil that evaluates rainfall, transpiration and relative soil water content over a period of 5 months (GRAS, 2006), together with history of inoculation practices, was used to select contrasting and potentially informative sites in northern and southern regions of Uruguay (Table 1). Ten *L. corniculatus* (at least one year-old) plants were collected from five locations selected at random at each site in the northern and southern regions. Roots were washed and all the nodules from the taproot and lateral roots were removed. Nodules were surface sterilized for 1 min in 90% (v/v) ethanol followed by 3 min in 4% (v/v) NaClO, then washed three times in sterile distilled water and stored in 25% (v/v) glycerol at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analyzed. At least three nodules from each plant were selected randomly, crushed individually and 10  $\mu\text{L}$  aliquots plated on yeast extract-mannitol (YEM) agar to isolate single colonies. The isolates recovered from nodules of plants were assigned numbers preceded with N (North) or S (South), depending of the region of origin (Table 1).

### 2.2. Nodulation and symbiotic performance tests

Seeds of *L. corniculatus* 'San Gabriel' and *L. uliginosus* L. 'Grasslands Maku' were surface sterilized for 4 min in 90% (v/v) ethanol followed by 4 min in 20% (v/v) NaClO and rinsed three times in sterile distilled water. Seeds were germinated on sterile water-agar in Petri dishes in the dark at  $25^{\circ}\text{C}$ . After 3 days, seedlings were transferred to tubes containing nitrogen-free Jensen medium (Jensen, 1942) and inoculated with suspensions of individual rhizobial isolates. Tubes were placed in a growth chamber at  $23^{\circ}\text{C}$ , 15 h of light ( $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 65% relative humidity for 30 days. Plants were considered nodulated when at least one nodule was visible after 20 days and  $\text{Fix}^+$  when plants did not show N-deficiency symptoms 65 days post-inoculation.

After characterizing a number of isolates as symbiotically effective, selected isolates were tested for their symbiotic performance. This involved determining the level of increase in plant biomass when the selected isolate was in symbiosis with *L. corniculatus*. Results obtained were compared with untreated control plants, and those fertilized with nitrogen or those inoculated with strain U510. Isolates that induced  $\text{Fix}^+$  nodules in symbiosis with *L. uliginosus* L. 'Grasslands Maku' were also tested for plant biomass production with regard to the commercial inoculant for *L. uliginosus*, strain U526. Seedlings, prepared as indicated above, were planted in

pots containing 400 g sterile vermiculite:sand 1:1 (v/v) and maintained at field water capacity with Hornum plant growth medium (Handberg and Stougaard, 1992) without N. Single colonies of isolates to be tested were grown 24–48 h in YEM broth. The cultures were then washed and diluted with 0.9% (v/v) NaCl solution to  $\text{OD}_{600}$  0.6 and 10 mL were inoculated onto eight 4 mm long seedlings in each pot. After 15 days three plants per pot were selected and the rest were removed. Three harvests of aerial mass were made at 40, 80 and 120 days after bird's foot trefoil inoculation. Plants were grown in a growth chamber until the first harvest and afterwards transferred to a greenhouse. Aerial mass was dried at  $65^{\circ}\text{C}$  for 5 days to determine dry weight.

### 2.3. Genomic DNA isolation

Isolates were grown as 1.5 mL cultures for 24–48 h in YEM broth, harvested by centrifugation at  $8000 \times g$ , at room temperature in a microspin centrifuge (SIGMA 113, Germany) washed twice with 1 mL of 1 M NaCl and once more with 1 mL Milli-Q water (Easy pure LF Barnstead, U K). Bacterial pellets were resuspended with 100  $\mu\text{L}$  Milli-Q water and DNA was extracted by boiling for 15 min. Samples were then incubated at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 min and centrifuged 10 min at  $12000 \times g$  (Agius et al., 1997). The supernatants obtained were used as templates for PCR amplification.

### 2.4. ERIC-PCR genomic fingerprinting

Genomic DNA was PCR amplified using the ERIC consensus primers ERIC1R and ERIC2 (de Bruijn, 1992) as described by Agius et al. (1997). Computer-assisted analysis of the ERIC-PCR genomic fingerprints was done using GelCompar 4.0. The similarity between pairs of ERIC-PCR genomic fingerprints was estimated using the Dice band-based similarity coefficient and average linkage (UPGMA).

### 2.5. PCR amplification and RFLP analysis of 16S rRNA genes

Nearly full-length 16S rRNA genes were amplified from isolates using primers 41f and 1488r following the protocol of Herrera-Cervera et al. (1999). The amplified 16S rRNA gene fragments were digested with endonucleases *HinfI* or *MspI* and grouped according to their restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns into rRNA gene ribotypes (Estrella et al., 2009).

### 2.6. Biodiversity analysis

The Shannon index ( $H$ ) was calculated as  $H = -\sum p_i \log_{10} p_i$  where  $p_i$  is the proportion of clones belonging to the/or  $i$ th phylotype, relative to the total number of clones (Shannon and Weaver, 1949). Shannon equitability ( $J$ ) was calculated by dividing  $H$  by  $H_{\text{max}}$ , where,  $H_{\text{max}}$  was  $\log_{10} N$ ,  $N$  the total number of phylotypes for each category analyzed. Simpson's index,  $D$ , and its reciprocal,  $1 - D$ , was calculated with  $D = \sum n(n-1)/(N-1)$ , and where  $n$  was the number of each phylotype. Diversity indices were compared when possible using one-way ANOVA with Infostat/L ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)).

### 2.7. Sequencing of 16S rRNA, ITS, *atpD*, *nodC* and *nifH* loci

The 16S rRNA genes were amplified as noted above (Herrera-Cervera et al., 1999). The ITS regions were amplified using primers FGPS1490-72F/FGPL132'-38R (Normand et al., 1996) using the 16S rRNA gene fragment amplification conditions. *atpD* genes were amplified using primers *atpD*-273F and *atpD*-771R as described by Weir et al. (2004). The *nodC* and *nifH* gene fragments were amplified

**Table 1**

Information of nine collection sites where rhizobia were isolated from *L. corniculatus* plants. All sites were farmers' fields except La Estanzuela South that corresponds to the 43 years old ley farming experiment at the National Institute for Agricultural Research.

Site	Latitude and Longitude	Years since last inoculation	Isolate code	AWC* (mm)	Soil characteristics		
					pH (water)	Organic C %	P Bray ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Colonia Itapebí North	S 31°44'17.2" W 57°30'65.0"	1	3,6,13,17,22, 25,32,33,39,44, 45,51,54,59,63,67, 72,73,81,83	38 ± 11	5.7	3.87	5.8
Queguay Chico North	S 32°04'04.4" W 57°04'48.0"	1	509,510,513,514,517, 522,525,529,532, 535,538,540,541, 542,546,551,558, 559,563	21 ± 8	6.5	3.96	5.2
Laureles North	S 31°54'60.4" W 57°56'99.1"	2	102,105,119,121,125, 132,133,137,139, 141,144,146,148, 150,152,154,161,165, 171,177	39 ± 11	6.4	3.10	0.9
Cangue North	S 32°34'91.0" W 58°40'70.6"	Never inoculated	362,424,432,438,441, 447,448,451,458,464, 472,484,490,494,496, 500,504,1116,1117,1120	56 ± 16	6.1	1.96	7.5
Paso Hospital South	S 34°07'29.4" W 57°40'39.0"	1	781,783,786,789, 792,796,798,801,804,807, 810,813,822,825,828,834	86 ± 25	6.4	2.06	20.9
Colonia Cosmopolita South	S 34°21'12.4" W 57°24'08.8"	Never inoculated	841,844,846,849,852, 856,858,864,870, 874,876,880,883, 888,892,896,897,901	86 ± 25	5.9	1.21	18.1
Paso Juan Soler South	S 34°36'03.4" W 56°81'45.7"	Never inoculated	630,634,644,646, 650,654,662,666,670, 673,677,681,1382,1386, 1387,1390,1391,1403	98 ± 21	6.5	1.14	0.9
San Pedro South	S 34°20'42.0" W 57°46'50.9"	2	904,909,912,919,921, 924,927,930,933, 937,940,945,948,956, 957,962	85 ± 25	6.7	2.35	2.4
La Estanzuela South	S 34°20'47.7" W 57°72'62.3"	1	1023,1027,1032,1044, 1047,1051,1063,1070, 1072,1075,1076,1232,1233, 1235,1274,1297,1300,1301, 1302,1305,1314	85 ± 24	6.0	2.0	21.5

\* AWC: Available water content in the soil (mm).

Mean ± standard deviation from 1st January to 31st May 2006 estimated for periods of 10 days (GRAS, 2006).

with primer pairs *nodCF2/nodCI* and *nifH1/nifHF*, respectively, following the method of Laguerre et al. (2001). PCR amplified products were run on 1% agarose gels, the corresponding DNA bands excised, purified (QIAquick Gel extraction, Qiagen, Germantown, MD) and sequenced (Macrogen, Inc., Seoul, Korea). The sequences obtained were compared with the sequences of reference strains available in public databases GenBank and EMBL using the BLASTN program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 2.8. Phylogenetic analysis

Sequence alignments were done with ClustalW software from the EMBL server (<http://www.ebi.ac.uk/>). Aligned sequences were analyzed using MEGA software, version 4.0 (Tamura et al., 2007). Phylogenetic analysis of the 16S rRNA and *nifH* gene sequences was done using the UPGMA algorithm (Sneath and Sokal, 1973). Phylogenetic analyses of ITS, *atpD* and *nodC* sequences were done using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The phylogenetic distances computed using the *p*-distance method were calculated based on the proportion of different nucleotides (*p*-distance), which was obtained by dividing the number of nucleotide differences by the total number of nucleotides compared (Nei and Kumar, 2000). Statistical support for tree nodes was evaluated by performing bootstrap analysis (Felsenstein, 1985).

## 3. Results

### 3.1. Identification of symbiotically effective isolates from *L. corniculatus* nodules

Rhizobial isolates were recovered from nodules of *L. corniculatus* growing in southern and northern Uruguayan regions with different AWC. The mean AWC for 5 months before nodule collection was 38 and 88 mm for the northern and southern regions, respectively (GRAS, 2006; Table 1). The combination of overgrazing with low growth rate under drought conditions in the north led to severe pasture degradation with infrequent stands of legumes, whereas good plant density and development was common in the southern region. Most sites had a history of inoculation, but there were three sites, one in the north, where the inoculant had not been applied previously. All 168 isolates in Table 1 were confirmed as symbiotically effective in *L. corniculatus*. 40 isolates were also tested with *L. uliginosus* as macrosymbiont and only 5 (N3, N33, N141, N441 and S956) induced Fix<sup>+</sup> nodules in this species.

### 3.2. Analysis of ERIC-PCR genomic fingerprints

DNAs from the 168 isolates and the commercial strain U510, were used as templates for PCR with ERIC primers to obtain DNA



fingerprints. In general, DNA from individual isolates amplified a large number of fragments (up to 20), with sizes ranging from 200 bp to 3000 bp. Initially, ERIC fingerprints of isolates from each site were analyzed as a single population or community to determine similarities and to identify potential siblings. Two or more isolates were considered siblings when sharing 60% or more of the amplified DNA fragments. Thus, 104 unique fingerprints were identified among the 168 isolates examined. The ERIC-PCR analysis suggested a high level of genetic diversity among the isolates (Fig. S1). Similar ERIC fingerprints were generated from isolates from locations distant from one another and in both regions. A high degree of diversity was apparent among isolates from either region, and often among isolates from a given site. The Shannon diversity index ( $H$ ) was similar ( $p=0.15$ ) for isolates from both regions ( $1.18 \pm 0.02$  northern and  $1.11 \pm 0.09$  southern). The equitability index ( $J$ ), which provides an estimate of the uniformity of the ERIC profile distribution in both regions, was near the maximum for both northern 0.97, and southern 0.96 communities. The Shannon diversity index was also similar ( $p=0.21$ ) for isolates from sites previously inoculated with strain U510 ( $1.11 \pm 0.1$ ) and those with no history of U510 inoculation ( $1.18 \pm 0.09$ ). There was no significant difference between the Simpson indices for northern (0.63) and southern (0.61) sites, respectively ( $p=0.19$ ). In addition, the species richness was similar for isolates obtained from southern and northern regions. Finally, a unique fingerprint was generated from commercial strain U510 that did not correspond to any of the 168 isolates.

### 3.3. RFLP analysis of amplified 16S rRNA gene fragments

A fragment of the 16S rRNA gene of each of the 104 isolates with distinct ERIC fingerprints was PCR amplified, and in each case resulted in a single band of about 1500 bp. This size corresponded to the expected size of 16S rRNA genes for most members of the *Rhizobiaceae*. Endonucleases *HinfI* and *MspI* were selected for RFLP analysis, giving rise to 4 and 2 different restriction patterns, respectively. Isolates having identical restriction patterns were assigned into ribogroups designated with arbitrary letters (Table S1). Among the 104 isolates analyzed, 4 ribogroups were distinguished, each comprising 1–91 isolates. Ribogroup I, which included the commercial strain U510, consisted of 86% and 89% of the isolates from the southern and northern regions, respectively. Isolates from ribogroups II, III, and IV were represented only by 1–9% of the total isolates analyzed. Ribogroup IV comprised only one isolate from a site with no history of inoculation with strain U510. When the distribution of ribogroups among sites was examined, southern and northern sites did not show a significant difference in diversity as indicated by the Shannon index  $H=0.21$  and 0.23 for northern and southern sites, respectively. Thus, the 16S rRNA RFLP patterns were uniformly distributed in both regions ( $J=0.13$ ).

### 3.4. Analysis of 16S rRNA, ITS and *atpD* sequences

Near full-length 16S rRNA genes from 15 representative isolates belonging to the four ribogroups (Table S1) were PCR amplified and sequenced. Fig. 1 shows a phylogenetic tree based on the similarity of the 16S rRNA gene sequences of selected isolates and reference strains. All the isolates from Uruguay were related to the genus *Mesorhizobium*.

Strains from ribogroup I, including N3, N33, N105, N141, N441, S673, S1274, and commercial inoculant U510 clustered with *M. huakuii*, *Mesorhizobium* sp. MAFF303099 and *Mesorhizobium* sp. NZP2037 isolated from *L. divaricatus* (Fig. 1). Isolate N362 (ribogroup IV) clustered with *M. septentrionale* CCBAU 83281 and the *M. amorphae* ACC19665 reference strain, and shared 99%

sequence identity with the *L. tenuis* isolate ML108 (Estrella et al., 2009). Isolates N125, S789, S956 and S1302, from ribogroup II and isolates S828 and S948 from ribogroup III were 99.9% identical and showed a single mismatch within a *HinfI* restriction site. These isolates clustered with *M. caraganae*, *M. tianshanense* A-1Bs, a strain isolated from *Glycyrrhiza pallidiflora*, with *M. metallidurans* and with the *M. gobiense* and *M. tarimense* type strains (Fig. 1). None of the strains clustered with the *M. loti* type strain NZP2213. No relationship was found between the site from which a given isolate was obtained and 16S rRNA gene phylogeny.

Genotypic variation among isolates was also assessed after amplification and sequencing of the 16S–23S internal transcribed spacer (ITS). All strains except N3 generated a single band ranging from 800 bp to 1500 bp. The ITS phylogeny of the isolates was very similar to the corresponding 16S rRNA genes (Fig. 2).

An *atpD* gene fragment of about 600 bp was amplified from isolates N105, S673, S1274 and the commercial U510 from ribogroup I, S948 from ribogroup II, S789 and S1302 from ribogroup III and N362 of ribogroup IV, sequenced and used for phylogenetic analysis (Fig. 3). The 16S rRNA gene and ITS phylogenies were consistent with and confirmed by the *atpD* gene phylogenetic analysis (Figs. 1–3). *atpD* genes from ribotype I isolates clustered with *M. huakuii* and *Mesorhizobium* sp. MAFF303099, those of ribotypes II and III with *M. caraganae* and ribotype IV with *M. septentrionale*.

### 3.5. Analysis of *nodC* and *nifH* gene sequences

The sequences of the *nodC* and *nifH* gene fragments were obtained for strain U510 and 11 isolates that represented the four ribotypes and regions of origin. A fragment about 800 bp was amplified for the *nodC* gene and a 335 bp fragment for the *nifH* gene. Phylogenetic analyses of *nodC* and *nifH* sequences are shown in Figs. 4 and 5, respectively.

All *nodC* genes from our isolates clustered with *nodC* from narrow host-range *Lotus* symbionts. Isolates N105, N141, N362, S673, S786, S789, S828, S956, S1302 and the commercial strain U510 were located in the same branch as *M. loti* reference strains R7A, and NZP2213<sup>T</sup>, *Mesorhizobium* sp. MAFF303099, *M. tarimense* CCBAU83306<sup>T</sup> and with different *Mesorhizobium* strains (CPS20, CPS13 and BD56) isolated from *L. corniculatus* and *L. tenuis* in Spain and Argentina, respectively (Estrella et al., 2009; Lorite et al., 2010a, 2010b) (Fig. 4). The *nodC* sequences from N3, N33 and N441, together with *nodC* from *Mesorhizobium* sp. strain BA151 isolated from *L. tenuis* in the Salado river basin in Argentina clustered in a branch different from the majority of the Uruguayan isolates (Estrella et al., 2009).

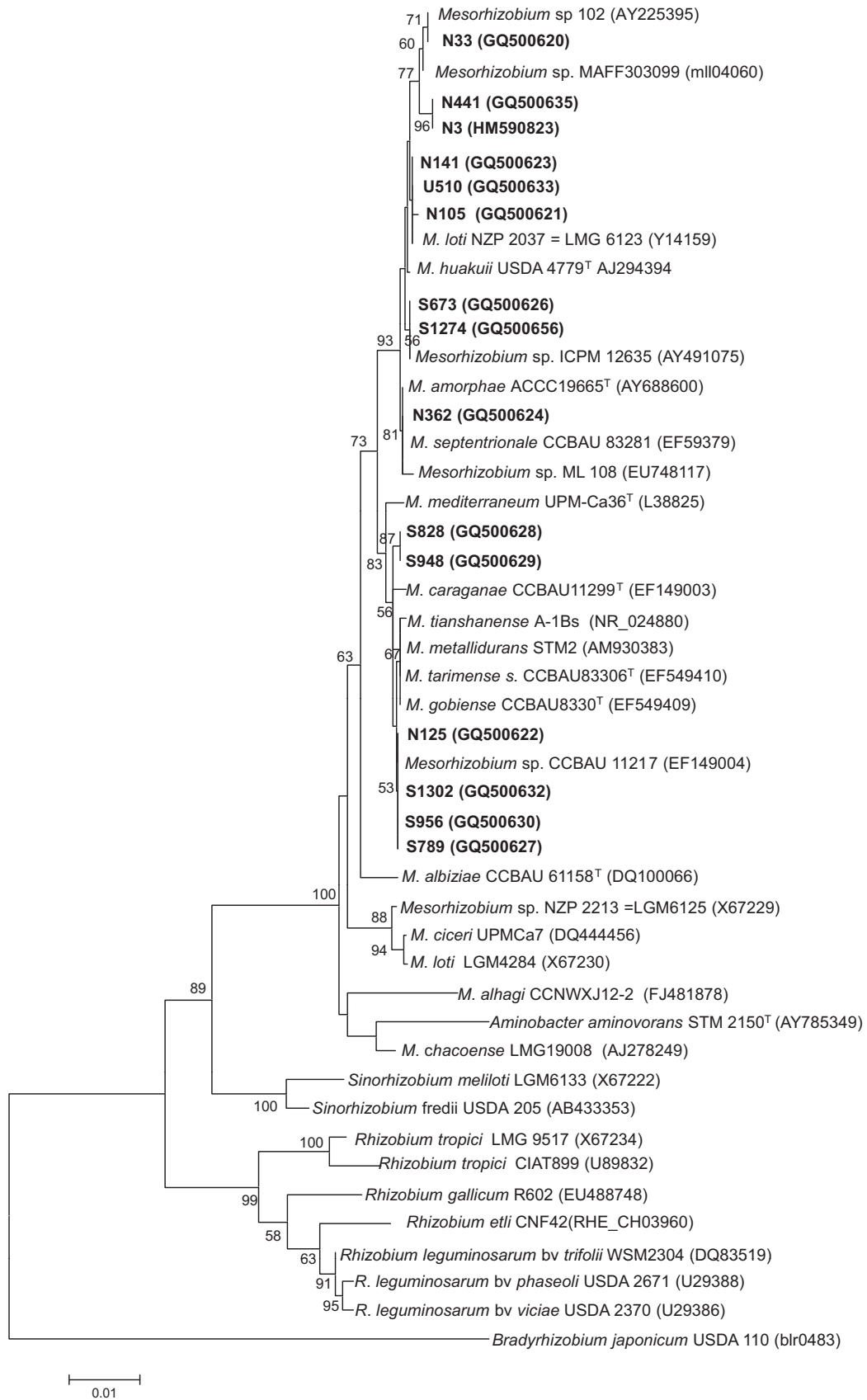
The *nifH* sequences from all isolates clustered with *nifH* genes from *M. loti* R7A and *Mesorhizobium* sp. MAFF303099, *M. tarimense*, and with other isolates from *L. tenuis* and *L. corniculatus* from Argentina and Spain (Fig. 5). Like the other sequences analyzed, phylogenetic analysis of *nifH* and *nodC* sequences clearly included the Uruguayan *Lotus*-nodulating rhizobia with the reference *Lotus*-symbiotic bacteria.

### 3.6. Symbiosis

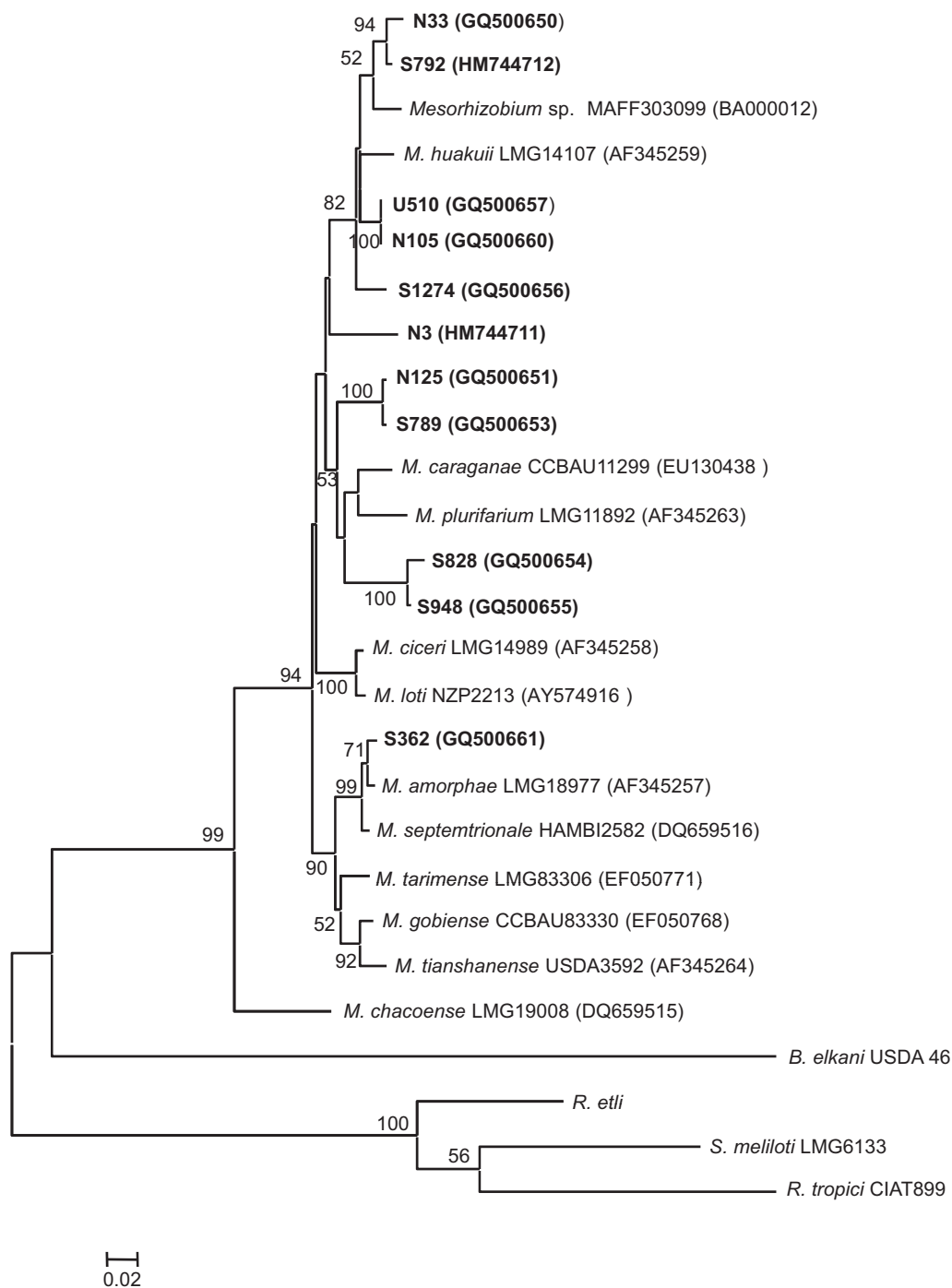
Ten isolates representing all ribogroups and sites of origin were tested for symbiotic efficiency with *L. corniculatus*. Accumulation of plant dry weight after three consecutive harvests after inoculation with the isolates was compared with untreated plants, those fertilized with nitrogen or inoculated with commercial strain U510. *L. corniculatus* plants inoculated with 8 of the isolates resulted in similar levels of total dry weight compared with plants inoculated with the commercial inoculant (Table 2).

The 5 isolates able to form effective nodules with *L. uliginosus* as macrosymbiont (N33, N3, N441, N141 and S956) were equally effi-





**Fig. 1.** Phylogeny of 16S rRNA genes. Tree showing the phylogenetic relationships among 14 rhizobia isolated from nodules of *L. corniculatus*, the inoculant strain U510 and other rhizobia, based upon aligned sequences (1297 nt). Bootstrap probabilities are indicated at the branching points (only values greater than 50% are shown). Accession numbers are written after the species name. The scale bar represents 1 per 100 nucleotide substitutions.



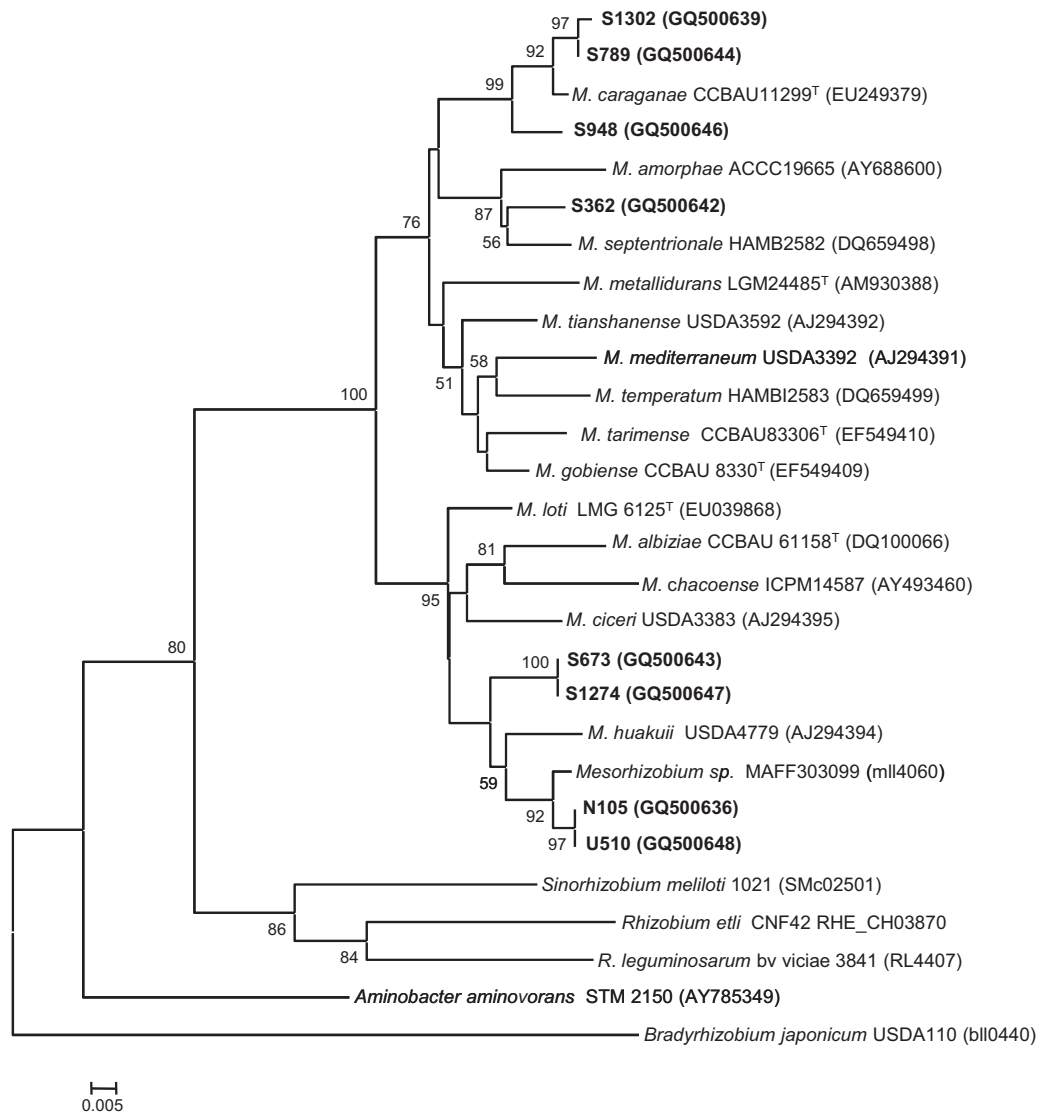
**Fig. 2.** Comparative sequences analysis of 16S–23S intergenic spacer (ITS). Tree based on ITS region sequences for 10 representative isolates nodulating *L. corniculatus*, the commercial inoculant strain U510 and other rhizobia, based upon aligned sequences (722 nt). Bootstrap probabilities are indicated at the branching points (only values greater than 50% are shown). Accession numbers are written after the species name. The scale bar represents 2 per 100 nucleotide substitutions.

cient, but produced less dry weight than the commercial inoculant *Bradyrhizobium* sp. strain U526 (data not shown).

#### 4. Discussion

We initially compared ERIC-PCR profiles of 168 isolates from southern and northern regions of Uruguay to estimate the effect of drought stress or AWC and inoculation history on diversity of native or naturalized rhizobia capable of effectively nodulating *L. corniculatus*. This analysis revealed similar levels of diversity among

the isolates from southern and northern regions as indicated by the Shannon indices. AWC and inoculation history did not appear to influence diversity or richness of these communities. The equitativity index was near the maximum for both regions due to the high proportion of phylotypes represented by a single isolate at a given site. The rainfall differences may have not been high and/or long enough to affect the diversity of northern versus the southern populations. Barring other environmental factors, however, this study suggests that the diversity and richness of rhizobia present in nodules of adult plants that had survived a significant drought stress was similar to those not undergoing this stress. [Eaglesham](#)



**Fig. 3.** Phylogenies of *atpD* genes. Tree showing the phylogenetic relationships among 7 Uruguayan isolates from *L. corniculatus*, the commercial inoculant strain U510 and other rhizobia based upon aligned sequences (385 nt). Bootstrap probabilities are indicated at the branching points (only values greater than 50% are shown). Accession numbers are written after the species name. The scale bar represents 5 per 1000 nucleotide substitutions.

**Table 2**

Average dry weight of three measurements of aerial parts from 5 plants inoculated with rhizobia isolates and the commercial inoculant.

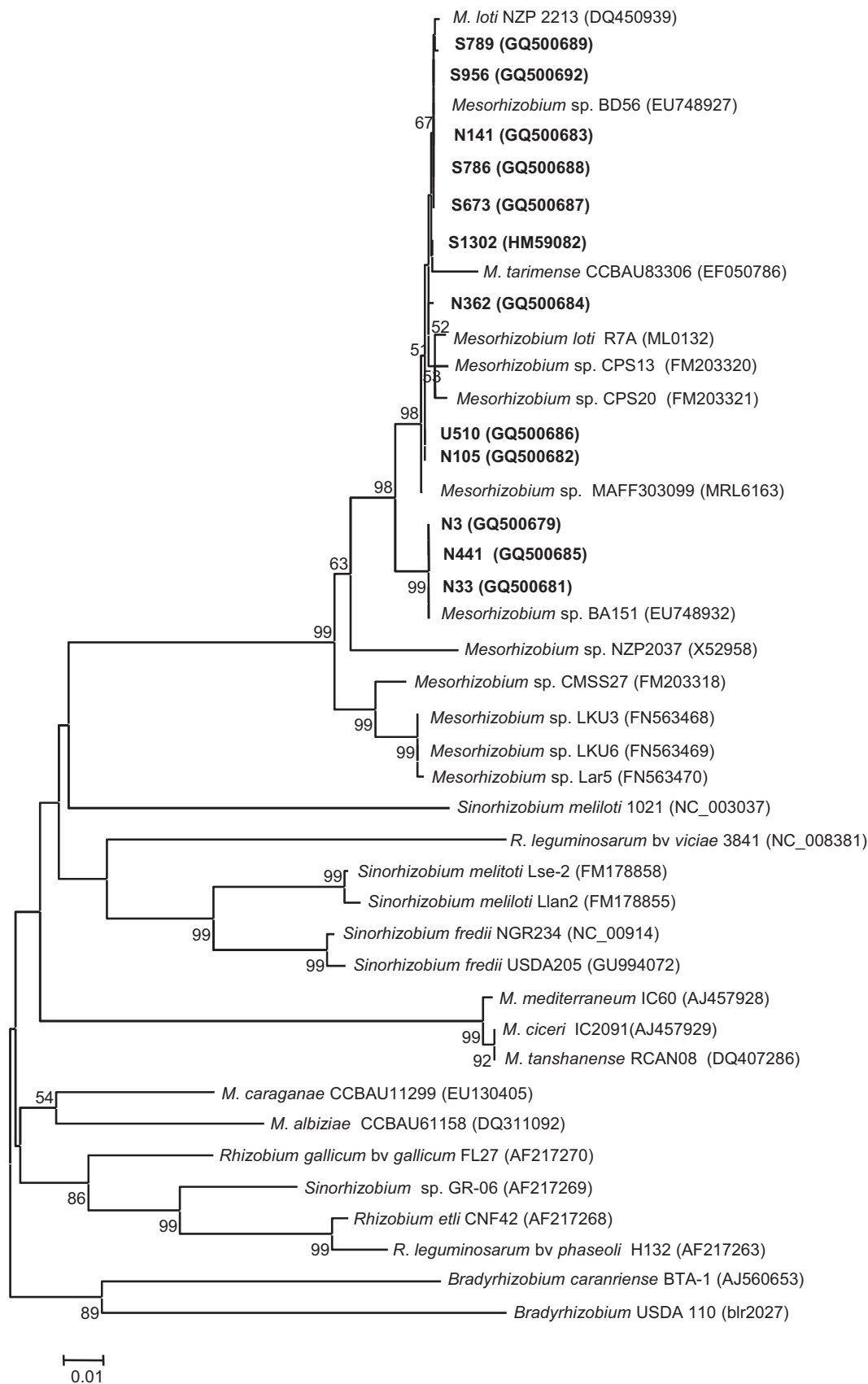
Strains	Ribogroup	Dry weight (mg)
U510	I	898 <sup>a</sup>
N125	II	818 <sup>a</sup>
S948	III	896 <sup>a</sup>
N441	I	782 <sup>ab</sup>
N22	I	800 <sup>ab</sup>
S673	I	688 <sup>abc</sup>
N141	I	730 <sup>abc</sup>
S804	II	723 <sup>abc</sup>
N362	IV	740 <sup>abc</sup>
N121	I	586 <sup>bc</sup>
S897	I	563 <sup>c</sup>
Control (N)		1217

Values followed by the same letter are not statistically different ( $p=0.05$ )

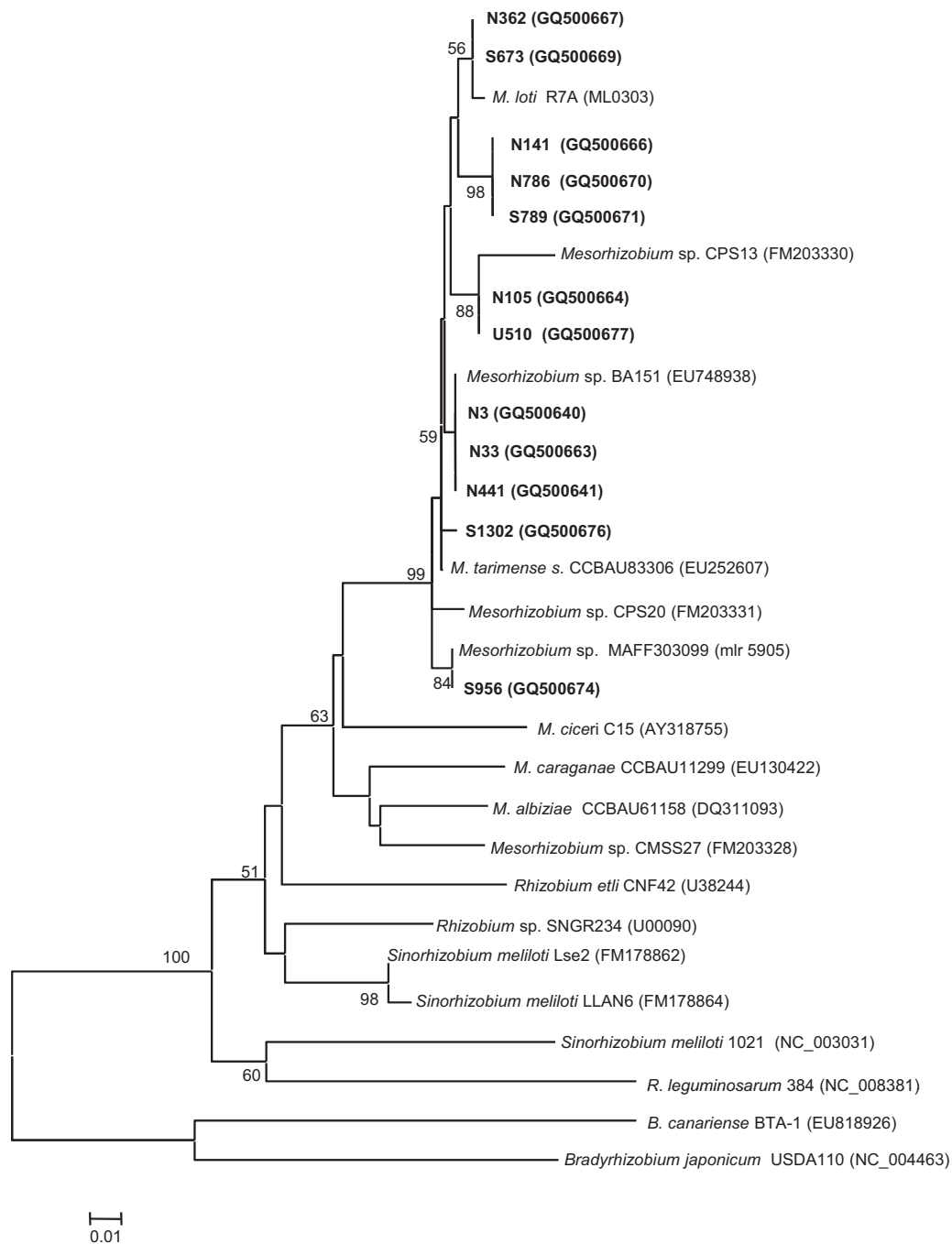
and Ayanaba (1984) and Swaine et al. (2007) reported a reduction of rhizobial populations after drought but diversity was not studied. In addition, no correlation was found between the regional origins of the isolates and the apparent diversity and evenness. Thus, a bio-

geography distribution like the one described for chickpea rhizobia in Portugal could not be made (Alexandre et al., 2009). There is not yet an ecological framework to understand the different rhizobial adaptation to different environments (Andrade et al., 2002). Maintaining rhizobial diversity could be key to ensuring resilience to further environmental stress, as appears to be the case for other organisms (Girvan et al., 2005).

A total of 104 distinct isolates could be assigned to one of four ribogroups using 16S rRNA gene RFLP analysis. Analysis of 16S rRNA gene segments of 14 selected rhizobial isolates representing all ribogroups plus the commercial inoculant indicated strong relationships of all strains with the genus *Mesorhizobium*. The 16S rRNA gene, ITS and housekeeping genes such as *atpD*, *glnI*, *glnII*, *recA*, etc., have been used in taxonomic and phylogenetic studies of rhizobia (Rivas et al., 2007; Gaunt et al., 2001). We performed phylogenetic analyses of two housekeeping genes, 16S rRNA and *atpD*, plus the ITS regions (Figs. 1–3), which clustered isolates from ribogroup I with the type strain of *M. huakuii*, and *Mesorhizobium* sp. MAFF303099, which has been proposed to be reclassified as *M. huakuii* biovar *loti* (Turner et al., 2002). Isolates closely related to *M. huakuii* and *Mesorhizobium* sp. NZP2037 were also isolated from



**Fig. 4.** Neighbor-joining tree of *nodC* gene sequences. Tree showing the relationship among 11 Uruguayan isolates from *L. corniculatus*, the commercial inoculant strain U510 and other rhizobia based upon aligned sequences (491 nt). Bootstrap probabilities are indicated at the branching points (only values greater than 50% are shown). Accession numbers are written after the species name. The scale bar represents 1 per 100 nucleotide substitutions.



**Fig. 5.** Phylogenies of *nifH* genes. Tree showing the relationship among 11 Uruguayan isolates from *L. corniculatus*, the commercial inoculant strain U510 and other rhizobia based upon aligned sequences (258 nt). Bootstrap probabilities are indicated at the branching points (only values greater than 50% are shown). Accession numbers are written after the species name. The scale bar represents 1 per 100 nucleotide substitutions.

*L. tenuis* nodules in Argentina (Estrella et al., 2009). NZP2037 is a broad host range strain able to nodulate several legume genera. In the absence of a detailed taxonomic study, NZP2037 is frequently designated as *M. loti* since it was originally isolated from *L. divaricatus* and can efficiently nodulate several *Lotus* species (Pankhurst, 1977). Indeed, *Mesorhizobium* sp. NZP2037 was used as a commercial inoculant for *L. corniculatus* and *L. uliginosus* in Uruguay in the 1980s, however it is no longer used because it has a moderate to low nitrogen-fixing efficiency in both hosts (Irisarri et al., 1996). Our results indicate that NZP2037 is more closely related to other *Mesorhizobium* species than to the *M. loti* type strain, suggesting that its reclassification should be considered.

16S rRNA and ITS sequences of isolate N362 of ribogroup IV clustered with corresponding sequences from *M. septentrionale*/*M. amorphae*, however the *atpD* gene phylogeny supports the provisional assignment of this isolate as *M. septentrionale* (Figs. 1–3). This would be the first time that *M. septentrionale* is isolated from *Lotus*, although *Mesorhizobium* sp. ML108 isolated from *L. tenuis* in Argentina appears also related to this species (Fig. 1).

Strains included in ribogroups II and III were closely related to *M. caraganae*, *M. tianshanense*, *M. gobiense* and *M. tarimense* according to 16S rRNA and ITS phylogenies (Figs. 1 and 2), although *atpD* phylogenies clearly placed these isolates with *M. caraganae* (Fig. 3). Therefore, several species of rhizobia seem to nodulate

*L. corniculatus* in Uruguay, although *M. huakuii* strains appear the most abundant in nodules. However, none of the isolates appeared to be *M. loti*, considered the type species nodulating *L. corniculatus* (Jarvis et al., 1982). Similar results were found in previous studies where *M. loti*-like rhizobia were absent or infrequently found in different countries (Han et al., 2008; Estrella et al., 2009; Lorite et al., 2010a, 2010b). In these reports *Lotus* rhizobia were isolated from stressed environments, and Lorite et al. (2010b) suggested that *M. loti* strains may not be sufficiently adapted to such environments. The fact that *M. loti* could not be found in both northern and southern regions of Uruguay indicates it is not well adapted to the country's soil conditions.

Although no *M. loti*-like rhizobia could be identified among the Uruguayan isolates, they carried symbiotic genes highly similar to those of *M. loti*. The sequence of *nodC* of all isolates and of the commercial strain U510, clustered with *nodC* from *M. loti* NZP2213<sup>T</sup>, R7A and MAFF303099, *M. tarimense* and other isolates from *L. corniculatus* and *L. tenuis* from Spain and the Canary Islands (Fig. 4), (Han et al., 2008; Estrella et al., 2009; Lorite et al., 2010a, 2010b). Likewise the *nifH* gene sequences clustered with those of *Lotus*-nodulating bacteria isolated from different *Lotus* species from several countries. Thus, the Uruguayan isolates carry symbiotic genes closely related to rhizobia nodulating *L. corniculatus*, *L. tenuis* or *L. japonicus*, and exhibit genetic and phenotypic characteristics of the biovar *loti*.

The assay of *L. corniculatus* inoculated with strains belonging to different ribogroups showed no correlation between strain ribogroup and symbiotic performance. Ribotype I was present in all the sampling sites but its symbiotic efficiency was similar to that of other ribogroups. Most strains induced similar plant biomass weight as the commercial inoculant strain U510. Several strains isolated from *L. corniculatus* formed nitrogen-fixing nodules on *L. uliginosus*, as did NZP2037, a broad host range strain. This was surprising as it is well known the symbiotic incompatibility between the symbionts of *L. uliginosus* and *L. corniculatus*, and vice versa, between *L. corniculatus*-symbionts and *L. uliginosus* (Lorite et al., 2010a, 2010b; Estrella et al., 2009). Nevertheless, the five isolates that were efficient in both *Lotus* species did not show optimal symbiotic performance with *L. uliginosus*.

In spite of being used continuously as commercial inoculant for *L. corniculatus* in Uruguay since 1972 (Labandera et al., 1982), to our knowledge this is the first time that U510, a strain brought to the country from Australia, has been characterized at the molecular level. We show that the commercial strain U510, which has always been regarded as *M. loti*, is likely a *M. huakuii* bv *loti* strain. Although strain U510 had 16S rRNA, *atpD* and ITS sequences that were very closely related to those of many of our isolates, it produced an ERIC fingerprint that was unique and clearly distinguishable from the field isolates. There were several isolates producing ERIC fingerprints closely related to U510, which perhaps may be derivatives of U510 that have undergone genomic rearrangements after field release. However many isolates showed no close relationship with U510, indicating that they might be indigenous to Uruguay or naturalized strains that were introduced with seeds.

The fact that U510-like bacteria could not be isolated from field nodules, regardless the location or the history of inoculation of the fields sampled, and despite it has been continuously used as a *Lotus* inoculant for several decades, indicates that this strain is poorly adapted to the Uruguayan edaphoclimatic conditions. It is possible that U510 has low survival or persistence in these soils, which together with a possible low competitiveness for nodulation would explain its absence from nodules of our sampled collection. These characteristics may also explain the frequent failures of inoculation that have been observed since U510 began to be used in the country.

According to our results, ERIC fingerprinting was very useful to determine rhizobia strain diversity whereas 16S rRNA analyses allowed species identification. Besides, effective strains of *Mesorhizobium* were abundant and genetically diverse in Uruguayan soils. This diversity of rhizobia was not correlated with the geographical origin nor the different rainfall regimes. The existing diversity may be the basis for the selection of strains for future inoculants.

## Acknowledgements

Authors are grateful to the funding of grants from FONTAGRO FTG-787/2005 (LESI) and the European LOTASSA project (FP6-2005-INCO-DEV2-517617). We also thank CAF (Cooperativas Agrarias Federadas) for farmers' identification and R. Zarza for soil sampling.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.apsoil.2011.05.005.

## References

- Agius, F., Sanguinetti, C., Monza, J., 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 87–92.
- Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodríguez, S., Oliveira, S., 2009. Survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. Microb. Ecol. 58, 930–941.
- Andrade, D.S., Murphy, P.J., Giller, K.E., 2002. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4025–4034.
- Baraibar, A., Fioni, L., Guedes, M.E., Ljungren, H., 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* population in Uruguay. Pesq. Agrop. Bras. Brasília 34, 1011–1017.
- de Bruijn, F.J., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2180–2187.
- DIEA, 2007. Encuesta Agrícola "Invierno 2007". Serie Encuestas N(253). DIEA, MGAP, Montevideo, Uruguay, September, 2007, 44 p.
- Eaglesham, A.R.J., Ayanaba, A., 1984. Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and nitrogen fixation. In: Subba Rao, N.S. (Ed.), I: Current Development in Nitrogen Fixation. Edward Arnold Publishers, London, pp. 1–36.
- Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J., 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). Appl. Environ. Microbiol. 75, 1088–1098.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783–791.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilps, S.A., Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2037–2048.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., Glover, L.A., 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. Environ. Microbiol. 7, 301–313.
- GRAS. 2006. Agua Disponible acumulada cada 10 días y mensualmente. 1er Trimestre 2006. 2do. Trimestre 2006. Accessed: 1 June 2006. <http://www.inia.org.uy/online/site/1480701.php>.
- Han, T.X., Han, L.L., Wu, L.J., Chen, W.F., Sui, X.H., Gu, J.G., Wang, E.T., Chen, W.X., 2008. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 2610–2618.
- Handberg, K., Stougaard, J., 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. Plant J. 2, 487–496.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuán, J., 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. FEMS Microbiol. Ecol. 30, 87–97.
- Irisarri, P., Milnitsky, F., Monza, J., Bedmar, E., 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. Plant Soil 180, 39–47.
- Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J., 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 378–380.
- Jensen, H.L., 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants I. General characters of nodule-bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 66, 98–108.
- Labandera, C., Baraibar, A., Millán, A. 1982. Tecnología de Rhizobium. In: Anuario 1982. Plan Agropecuario, MGAP, Uruguay. Trabajos Técnicos III. pp. 11–15.

- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N., 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981–993.
- Lorite, M.J., Donate-Correa, J., Del Arco-Aguilar, M., Pérez Galdona, R., Sanjuán, J., León-Barrios, M., 2010a. Lotus endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 282–290.
- Lorite, M.J., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M., Sanjuán, J., 2010b. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4019–4026.
- Monza, J., Fabiano, E., Arias, A., 1992. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus*. *Soil Biol. Biochem.* 24, 241–247.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution And Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY.
- Normand, P., Ponsionnet, C., Nesme, X., Neyra, M., Simonet, P., 1996. ITS analysis of procaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.5, vol. 1–12. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Pankhurst, C.E., 1977. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can. J. Microbiol.* 23, 1026–1033.
- Rebuffo, M., Bemhaja, M., Risso, D., 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. *Lotus Newslett.* 36, 22–33.
- Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P.F., Oliveira, S., Martínez Molina, E., Velázquez, E., 2007. Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carry symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 412–418.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. *The Mathematical Theory Of Communication*. The University of Illinois Press, Urbana, pp. 177.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Co, San Francisco, CA.
- Swaine, E.K., Swaine, M.D., Killham, K., 2007. Effects of drought on isolates of *Bradyrhizobium elkanii* cultured from *Albizia adianthifolia* seedlings of different provenances. *Agroforest. Syst.* 69, 135–145.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Turner, S.L., Zhang, X.-X., Li, F.-D., Young, J.P.W., 2002. What does a bacterial genome sequence represent? Mis-assignment of MAFF 303099 to the genospecies *Mesorhizobium loti*. *Microbiology* 148, 3330–3331.
- Weir, B.S., Turner, S.J., Silvester, W.B., Park, D.C., Young, J.M., 2004. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume era of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5980–5987.
- Werner, D., 1992. *Symbiosis of Plants and Microbes*. Chapman and Hall, London; Glasgow; New York; Tokyo; Melbourne; Madras, p. 350.



## DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS CON HETEROCISTOS EN SUELOS CULTIVADOS CON ARROZ

P. Irisarri<sup>1</sup>, S. Gonnet<sup>1</sup>, E. Deambrosi<sup>2</sup> y J. Monza<sup>1</sup>.

Recibido: 25 de mayo de 1999. Aceptado: 20 de julio de 1999.

### RESUMEN

Para evaluar el uso potencial de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno con heterocistos como biofertilizantes naturales para el cultivo de arroz en Uruguay, se estudió su diversidad, cantidad y variación a lo largo del ciclo de cultivo en Paso de la Laguna (Treinta y Tres). Se comparó la diversidad y densidad de cianobacterias con heterocisto en distintos tratamientos: sin urea inoculado con cianobacterias, con urea sin inocular y un testigo sin nitrógeno y sin inocular. El inoculante comercial, mezcla seca de *Nostoc* sp. y *Tolypothrix tenuis* se aplicó al doble de la dosis recomendada. Al tratamiento que se pretendía libre de cianobacterias, se le agregó  $\text{CuSO}_4$  (2,5 K/ha). Alrededor del 90% de las cianobacterias con heterocisto encontradas en todos los tratamientos correspondieron a los géneros *Anabaena* y *Nostoc*. *Anabaena* fue el género dominante en el testigo y *Nostoc* en el resto de los tratamientos. Los géneros menos abundantes fueron *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema* y *Tolypothrix*. Colonias macroscópicas de *Gloeotrichia* sp. aparecieron doce semanas después de la inundación en todos los tratamientos. La mayor cantidad de cianobacterias,  $1,6 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> de suelo, se encontró en el testigo ocho semanas después de la inundación. En ese momento se encontraron los mayores valores de UFC/cm<sup>2</sup> de suelo en todos los tratamientos. La aplicación de urea en cobertura y la inoculación se asociaron con un menor número cianobacterias,  $1,6$  y  $1 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

**PALABRAS CLAVE:** cianobacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, cultivo de arroz.

### SUMMARY

#### DIVERSITY OF HETEROCYSTOUS CYANOBACTERIA IN RICE SOILS

To evaluate the potential use of nitrogen-fixing heterocystous cyanobacteria as natural biofertilizer for rice in Uruguay, the diversity, abundance and variation of these microorganisms along the crop cycle were studied at Paso de la Laguna (Treinta y Tres). Diversity and population density of heterocystous cyanobacteria were compared between a treatment without urea inoculated with cyanobacteria, other with urea application and without inoculum and a control without nitrogen and inoculum. The commercial inoculum used, dry mixture of *Nostoc* sp. and *Tolypothrix tenuis*, was applied at two-fold the recommended dose.  $\text{CuSO}_4$  (2,5 K/ha) was added to the control treatment pretending to reduce the native cyanobacterial population. About 90 % of the heterocystous cyanobacteria found in all treatments belonged to the genera *Anabaena* and *Nostoc*.

*Anabaena* was the dominant genus at the control treatment and *Nostoc* at the rest of the treatments. The less abundant genera were *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema* and *Tolypothrix*. Macroscopic colonies of *Gloeotrichia* sp. appeared in all the treatments twelve weeks after irrigation started. The highest value of cyanobacteria,  $1,6 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup>, was found at the control 8 weeks after the irrigation started. At this time of the crop cycle, the highest cyanobacterial numbers were found in all the treatments. The broadcasted application of urea and the inoculation were associated with less cyanobacterial density,  $1,6$  and  $1 \times 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>, respectively.

**KEY WORDS:** N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria, rice fields.

<sup>1</sup> Cátedra de Bioquímica, Area de Ciencias Biológicas, Facultad de Agronomía, Garzón 780, CP 12900 Montevideo, Uruguay.  
E-mail:irisarri@fagro.edu.uy

<sup>2</sup> INIA Treinta y Tres, Ruta 8 km 281, CP 33000, Treinta y Tres, Uruguay.



## INTRODUCCION

Las cianobacterias, también llamadas algas verde-azules, constituyen el grupo más diverso y abundante de procariontes que realizan fotosíntesis oxigénica. Además, varios géneros de cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), lo que las hace uno de los seres vivos con mayor independencia trófica. El ser los únicos organismos fijadores de  $N_2$  capaces de generar su propio fotosintato, hace que las cianobacterias sean especialmente atractivas para ser usadas como biofertilizante.

Los ensayos de inoculación de arroz con cianobacterias se justificaron inicialmente porque se creía que las cianobacterias diazotrofas eran escasas en los arrozales (Watanabe y Yamamoto, 1971). Estudios más recientes muestran sin embargo, la presencia consistente y con frecuencia abundante, de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos bajo cultivo de arroz (Roger, 1995). De todas formas, los resultados del empleo de inoculantes cianobacterianos para aumentar la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en cultivo de arroz son dispares. Se han observado fracasos en la sobrevivencia del inoculante (Reddy y Roger, 1991) pero también aumentos significativos en el rendimiento del arroz inoculado con cianobacterias (Yanni, 1996). De hecho, Roger (1995) sugiere que el éxito o fracaso de la inoculación dependería de las condiciones locales.

Por otro lado, se ha observado con frecuencia que la fertilización nitrogenada tiene un efecto negativo sobre la flora de cianobacterias (Roger *et al.*, 1984; Carreres *et al.*, 1996). El aporte de nitrógeno por FBN en cultivos de arroz se estima en hasta 75 kg de N/ha por ciclo de cultivo, con valores medios entre 8 y 30 kg de N/ha (Quesada *et al.*, 1997). Estos datos provienen de arrozales asiáticos y europeos y hasta el presente no se contaba con información sobre las poblaciones de cianobacterias diazotrofas en arrozales uruguayos, aunque era sabido que el cultivo de arroz utiliza más nitrógeno del que se aporta como fertilizante (Deambrosi, 1998). Este nitrógeno podría provenir de la FBN realizada por distintos tipos de organismos, heterótrofos o autótrofos, que se encuentran tanto en el suelo como asociados a la planta de arroz (Roger, 1995).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar, en un suelo típico de cultivo de arroz de la zona Este del Uruguay, la diversidad y abundancia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, así como los efectos de la aplicación de urea y de la inoculación sobre la presencia de dichos organismos.

## MATERIALES Y METODOS

### Diseño experimental

Los ensayos se realizaron en la Estación Experimental Paso de la Laguna (INIA, Treinta y Tres) en un suelo solod melánico, pH 5,3; C orgánico 1,51%, P (Bray 1): 6 ppm, K:0,26 meq/100 g, cuyo manejo previo fue laboreo de verano y ni-

velación sobre pradera de 2 años y laboreo reducido previo a la siembra. La variedad de arroz utilizada fue El Paso 144, sembrada el 28 de octubre de 1998, con una fertilización basal de 100 K/ha de 12/52/0 (N/P/K). La aplicación de los herbicidas, propanil y quinclorac, dosis 1,92 L/ha, se realizó el 26 de noviembre de 1998. La inundación se estableció el 8 de diciembre y la cosecha se realizó el 14 de abril de 1999.

Las parcelas experimentales de 13,2 m<sup>2</sup> se aislaron por taipas de 2,8 m de ancho y fueron regadas en forma independiente. El diseño fue de bloques al azar con 4 repeticiones y los tratamientos: testigo, cobre, urea e inoculado. El 30 de diciembre se realizó el tratamiento de  $CuSO_4$  (1.67 K/ha) con el objetivo de reducir las cianobacterias. El tratamiento con urea correspondió el agregado de 50 K/ha el 10 de diciembre. El tratamiento inoculado consistió en el agregado de una mezcla de *Nostoc* sp. y *Tolypotrix tenuis* (Rizobacter Argentina) a razón de 127.6 g/ha (la dosis recomendada por el fabricante es de 50 g/ha). La inoculación se realizó el 10 de diciembre.

### Muestreo y recuento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno

Las muestras de suelo sumergido se tomaron en una transecta de cada parcela, intentando no modificar la interfase suelo-agua, a partir del centímetro superior de 10 submuestras colectadas con jeringas de plástico de 10 cm de largo y 2.1 cm de diámetro cortadas transversalmente. Las muestras se tomaron a las 2, 4, 8 y 12 semanas después de la inundación y se guardaron en bolsas de plástico selladas que se mantuvieron en oscuridad a 4°C por tres días hasta su procesamiento. Los recuentos de las muestras se hicieron en superficie en medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979) agarrizado, sin nitrógeno y modificado sustituyendo el EDTA-NaMg por EDTA-Na<sub>2</sub>. Cada muestra de suelo fue disgregada con un homogeneizador y se realizaron diluciones seriadas en suero fisiológico. El pH del medio se ajustó a 7.6 con tampón HEPES 2.5 mM y se agregó cicloheximida (20 ppm) para evitar el crecimiento de contaminantes eucariotas. Se hicieron 4 repeticiones por cada dilución. Las placas se incubaron 4 semanas a 28 ± 2 °C con iluminación continua con lámparas fluorescentes de luz blanca (irradiancia 60 E.s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>). Los recuentos de cianobacterias con heterocisto se expresaron en unidades formadoras de colonia (UFC) por cm<sup>2</sup> de suelo (Roger *et al.*, 1991).

Las cianobacterias se clasificaron en cuatro grandes grupos (Tabla 1) de acuerdo a las características morfológicas de las colonias observadas directamente en las placas con microscopio estereoscópico e identificadas con microscopio óptico según Castenholz (1984). También se consideró para agruparlas la capacidad de formar colonias mucilaginosas de forma definida, característica asociada a la resistencia frente a predadores y contra la desecación (Roger *et al.*, 1987). El conteo de UFC se realizó también con microscopio estereoscópico. Para evitar el efecto de competencia entre colonias se contaron las placas que tenían entre 3 y 30 colonias.

## Aislamiento y obtención de cultivos unialgales

A partir de las placas de recuento se aislaron las cianobacterias pertenecientes a los distintos grupos según las diferencias observadas con microscopio óptico. Los sucesivos repiques se efectuaron con pipeta Pasteur a partir de filamentos en crecimiento o microcolonias, según Rippka (1988). Verificada la ausencia de otras cianobacterias, estos cultivos unialgales fueron, en primera instancia, pasados a medio líquido y luego liofilizados para su conservación.

**Tabla 1.** Grupos tipo de cianobacterias formadoras de heterocisto

- Grupo 1** Colonias mucilaginosas de forma definida. Al microscopio óptico presentan una cubierta gruesa y no tienen ramificaciones. El género representativo es *Nostoc*.
- Grupo 2** Colonias filamentosas de forma definida que forman curvas. Al microscopio óptico presentan filamentos libres sin hormogonios. Los géneros representativos son *Anabaena* y *Nodularia*.
- Grupo 3** Colonias aterciopeladas con filamentos que emergen del agar. Los géneros representativos son *Scytonema*, *Tolypothrix* (presentan falsas ramificaciones) y *Calothrix* (filamentos que se afinan en forma polar).
- Grupo 4** Colonias de forma definida con filamentos cortos. Al microscopio óptico presentan heterocistos exclusivamente terminales y acinetos adyacentes. El género representativo es *Cylindropermum*.

Todas las características se refieren a colonias provenientes de muestras de suelo diluidas y plaqueadas en medio BG11 agriado y sin nitrógeno.

## Análisis estadístico

Los estudios de la distribución de las cianobacterias en suelos inundados han demostrado que sus poblaciones tienen un patrón aproximado al logaritmo de la distribución normal (Roger *et al.*, 1991). Por esa razón, las variables estadísticas se calcularon usando los logaritmos de los datos originales y se emplearon muestras compuestas para disminuir la variabilidad de las mediciones.

## RESULTADOS

El número de cianobacterias formadoras de heterocistos de cada uno de los tratamientos en muestras de suelos inundados se presentan en la Tabla 2. El testigo fue el único que presentó diferencias significativas ( $P=0,05$ ) en el número de UFC de cianobacterias formadoras de heterocisto/cm<sup>2</sup> de suelo. La evolución de la población total de cianobacterias con heterocisto a lo largo del ciclo del culti-

vo fue similar en todos los tratamientos con excepción del tratamiento al que se agregó CuSO<sub>4</sub> (Figura 1). En todos los casos, el mayor número de UFC se registró a las 8 semanas de inundado el cultivo, que se corresponde con el estado fisiológico de la planta "embarrigado". El menor número de UFC se encontró a las 12 semanas, que corresponde al fin de la floración, comienzo de llenado de granos.

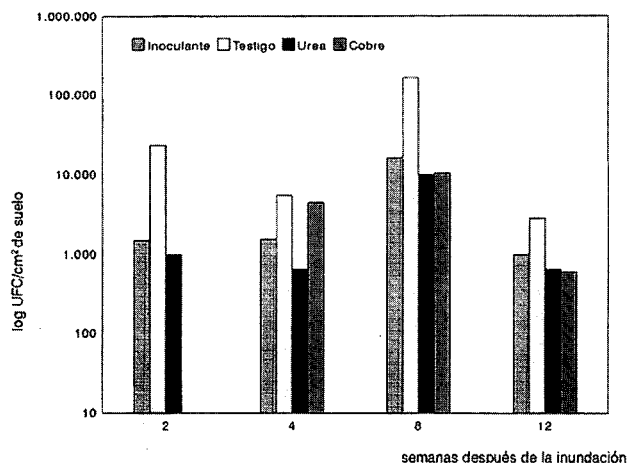
Para todos los tratamientos el porcentaje de cianobacterias de los grupos 1 y 2 constituye entre el 89 y el 99 % de la población total. *Anabaena* fue el género dominante en el testigo y *Nostoc* fue el dominante en el resto de los tratamientos (Tabla 2). Los porcentajes correspondientes a cada grupo a la octava semana de inundación se muestran en la Tabla 3. Las bacterias pertenecientes al género *Nostoc* fueron las más abundantes en todos los tratamientos con excepción del testigo.

En todos los recuentos se encontraron cianobacterias que no forman heterocistos pertenecientes a los órdenes *Chroococcales*, unicelulares del género *Gloeothece*, (Waterbury y Rippka, 1984) y *Oscillatoriales*, homocísticas, correspondientes a los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Pseudonabaena* (Castenholz, 1984).

**Tabla 2.** Población de cianobacterias (UFC x 10<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup> de suelo)<sup>a</sup>

Tratamiento	Grupo	2	4	8	12
Testigo	1	0	0	100	8
	2	230	55	1550	0
	3	0	0	0	5,5
	4	0	0	0	15
	<b>Total</b>	<b>230</b>	<b>55</b>	<b>1650</b>	<b>28,5</b>
Inoculado	1	0	9	105	4,5
	2	10	3,5	50	3,5
	3	5	3	5	1
	4	0	0	0	1
	<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15,5</b>	<b>160</b>	<b>10</b>
Urea	1	10	6,5	55	3
	2	0	0	35	0
	3	0	0	10	3,5
	4	0	0	0	0
	<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>6,5</b>	<b>100</b>	<b>6,5</b>
Cobre	1	ND	15	90	4
	2	ND	30	15	0,5
	3	ND	0	0	1
	4	ND	0	0	0,5
	<b>Total</b>	<b>ND</b>	<b>45</b>	<b>105</b>	<b>6</b>

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cuatro repeticiones. ND no determinado



**Figura 1.** Dinámica de las poblaciones de cianobacterias con heterocisto a lo largo del ciclo del cultivo.

Únicamente en el muestreo realizado 12 semanas después de inundado el cultivo, se observaron en el campo en todos los tratamientos colonias macroscópicas pertenecientes al género *Gloeotrichia*, de un diámetro promedio aproximado de 9 mm. Los afloramientos fueron escasos, pero las colonias epifíticas sobre hojas secas de arroz y asociadas a malezas eran abundantes. Estas colonias mucilaginosas de forma definida se identificaron como pertenecientes al género *Gloeotrichia* por sus filamentos polares observados con microscopio óptico. Un mes después estas colonias habían desaparecido.

En total se obtuvieron 30 aislamientos de cianobacterias, quince de los cuales corresponden al definido para este trabajo como Grupo 1, nueve al Grupo 2, cuatro al Grupo 3 y dos al Grupo 4. En la Figura 2 se muestra un aislamiento de cada uno de estos grupos.

**Tabla 3.** Porcentaje de cianobacterias pertenecientes a los distintos grupos en la octava semana después de la inundación.

Tratamiento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Testigo	6	94	0	0
Inoculado	66	31	3	0
Urea	55	35	10	0
Cobre	86	14	0	0

## DISCUSION

El cultivo de arroz en condiciones de inundación constituye un ambiente favorable para el crecimiento de las cianobacterias respecto a sus requerimientos de luz, agua, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Roger, 1995).

El mayor número de cianobacterias encontradas en este estudio fue de  $1,6 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> de suelo en el testigo, 8 semanas después de la inundación. Los valores promedio de UFC/cm<sup>2</sup> de suelo fueron  $4,9 \times 10^4$ , marcadamente menores que los encontrados en otras regiones arroceras del mundo. En Valencia (España) Carreres *et al.* (1996) encontraron, en tratamientos sin aplicación de fertilizantes nitrogenados, valores promedio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno de  $2,2 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>. En arrozales asiáticos con un manejo agronómico diferente que el anterior, se encontró un promedio de  $3,5 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> (Roger *et al.*, 1987) incluyendo las cianobacterias edáficas encontradas en el arrozal en estudio puede ser consecuencia del sistema de rotación particular en la que se alterna pradera y cultivo de arroz.

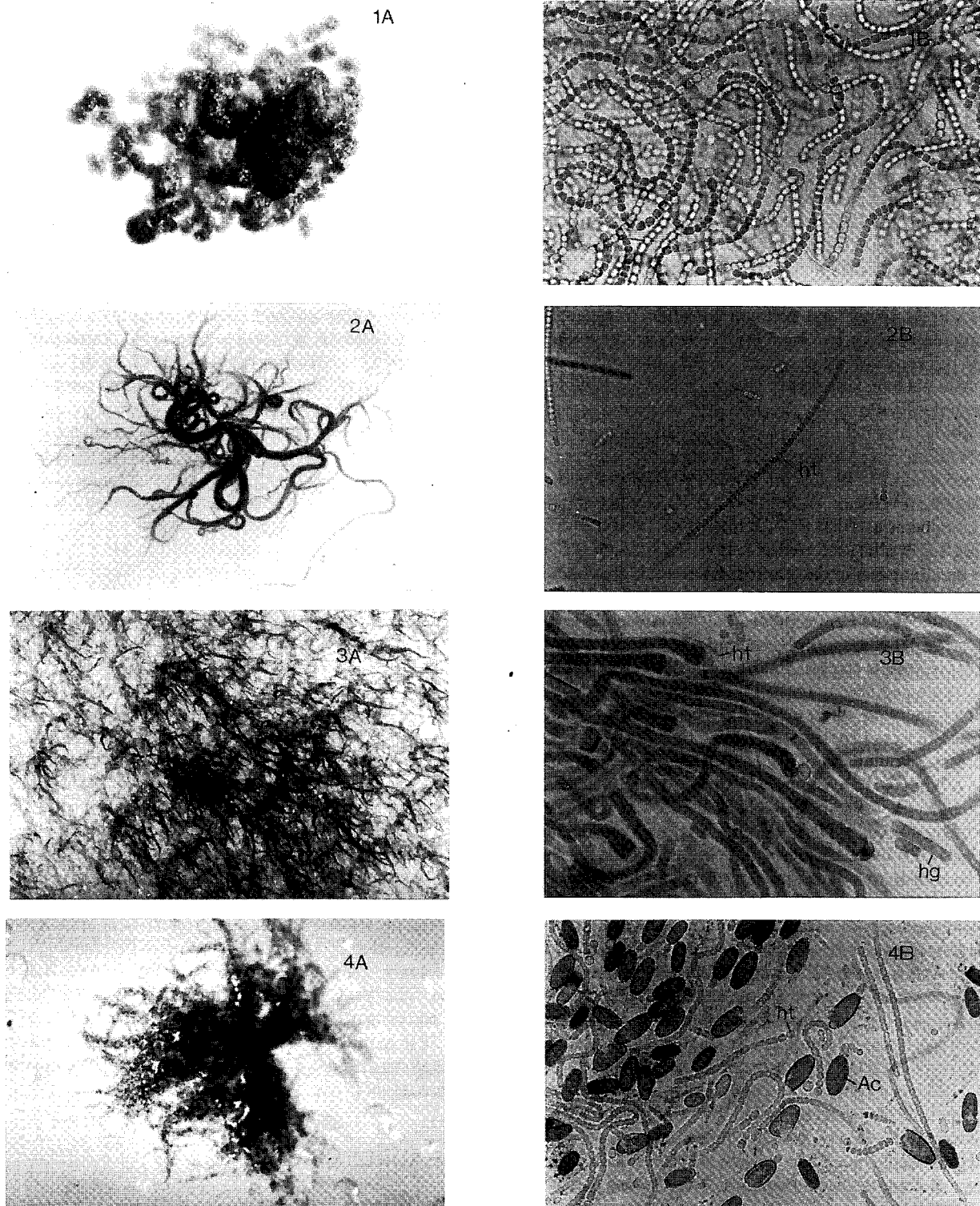
Se debe considerar que el método de dilución y plaqueo utilizado, no permite identificar las bacterias presentes en concentraciones bajas, de manera que los resultados corresponden únicamente a las cepas más abundantes en el suelo. A su vez, el empleo de un determinado medio de cultivo así como condiciones artificiales de crecimiento, puede resultar en la selección de algunas cepas mejor adaptadas a esas condiciones (Quesada y Fernández-Valiente, 1996). De todas formas, el método de plaqueo de suspensiones de suelos es el único que permite el recuento, la identificación y el aislamiento simultáneamente (Roger *et al.*, 1991).

El agregado de CuSO<sub>4</sub> para eliminar la población natural de cianobacterias del suelo no fue efectivo y si bien disminuyó el número de cianobacterias respecto al testigo, esta disminución no fue suficiente para considerar este tratamiento como control negativo. La aplicación de CuSO<sub>4</sub> no se repitió a lo largo del período de cultivo, por lo que se diluyó con los riegos y lluvias. Tal vez manteniendo la concentración de esta sal se pueda controlar eficazmente las poblaciones de cianobacterias.

Respecto a la diversidad de cianobacterias con heterocisto encontradas en Paso de la Laguna, alrededor del 90 % corresponden a los géneros *Anabaena* y *Nostoc*. En los arrozales de la Provincia de Corrientes (Argentina) no se encontraron especies pertenecientes a los géneros *Cylindrospermum* y *Gloeotrichia* (Prosperi *et al.*, 1996).

Por otra parte, en arrozales de Filipinas, India, Malasia, Tailandia y Portugal, en el 60 % de 102 suelos estudiados estaban presentes *Nostoc*, *Anabaena* y *Calothrix* (Roger *et al.*, 1987). Esto indicaría que no existe una especificidad ambiental respecto a los géneros presentes en diferentes suelos donde se cultiva arroz bajo diferentes formas de manejo del cultivo, aunque los géneros predominantes dependerían de las condiciones locales (Begum *et al.*, 1996).

Tanto en los arrozales españoles como asiáticos, con características muy diferentes a los nuestros, se ha encontrado con frecuencia afloramientos de *Gloeotrichia* como los comunicados en este trabajo. La ausencia de afloramientos de otras cianobacterias no sería debido a que no estuvieran



**Figura 2.** Cianobacterias aisladas de suelo cultivado con arroz en Paso de la Laguna (INIA Treinta y Tres). **A** Morfología de las colonias crecidas en placa observadas al microscopio estereoscópico (x 4) y **B** observaciones con microscopio óptico (x 40: 1 y 2 y 4; x 20: 3). ht: heterocisto. Ac: acinetos. hg: hormogonio.  
 1. *Nostoc* sp. 2. *Anabaena* sp. 3. *Calothrix* sp. 4. *Cylindrospermum* sp.

presentes, sino probablemente a que las condiciones ambientales fueron adversas o a que tuvieran una duración limitada que no coincidió con los momentos de muestreo, por lo que pasaron desapercibidos. Cabe destacar que *Gloeotrichia* es uno de los grupos de cianobacterias que forma colonias mucilaginosas, carácter que la hace menos susceptible al consumo por invertebrados predadores y más resistente a la desecación.

A lo largo del ciclo del arroz, se pudo observar una dinámica de las poblaciones de cianobacterias con un patrón similar en todos los tratamientos, con un máximo de densidad ocho semanas después de la inundación. En los arrozales asiáticos las fluctuaciones de la densidad de cianobacterias son similares, con un máximo a las 16 semanas de transplantado el arroz (Grant *et al.*, 1985) lo que coincide con la iniciación de la panícula. Al principio del ciclo de cultivo el pH bajo y un tenor elevado de CO<sub>2</sub> en agua favorecen el desarrollo de las algas eucariotas, mientras que en la segunda parte del ciclo, el aumento de la temperatura y del pH favorecen el desarrollo de las algas procariotas (Roger y Reynaud, 1976). Begum *et al.* (1996) también encontraron una correlación entre el pH del suelo y la población de cianobacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el mismo, que crecen preferentemente en medios con pH neutro o alcalino. Sin embargo, los mismos autores señalan que la variación de la cantidad de cianobacterias no dependía únicamente de esa propiedad del suelo, sino de la interacción de pH, C orgánico, contenido de N total y disponible y P disponible en el suelo. En arrozales españoles se ha demostrado que las características fisicoquímicas del agua explican mejor la variación de las cianobacterias que las características del suelo.

En el suelo estudiado, el pH inicial ligeramente ácido, pudo haber dificultado la proliferación inicial de las cianobacterias, si bien una vez establecida la inundación, el pH fue cercano a la neutralidad. Después de las 8 semanas de inundado el cultivo, el sombreado producido por la planta de arroz explicaría la disminución del número de cianobacterias.

Roger (1995) señala un efecto inhibitorio de los fertilizantes nitrogenados aplicados en cobertura sobre la población de cianobacterias nativas, mientras que la aplicación del fertilizante enterrado en el suelo no la afectaría. En nuestro país la práctica generalizada consiste en aplicar urea en cobertura y los resultados del recuento de cianobacterias mostraron un marcado descenso en el número de las mismas en este tratamiento respecto al testigo. En arrozales de Valencia, Carreres *et al.* (1996) encontraron una correlación negativa entre la abundancia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno y la cantidad de fertilizante nitrogenado empleada.

El tratamiento inoculado con una dosis de inoculante seco superior al doble de la recomendada, presentó una población significativamente menor de cianobacterias que el testigo. Yanni y Sehly (1991) encontraron que la aplicación de inoculante fresco era más eficiente que la de inoculante seco, ya que las cianobacterias necesitarían más tiempo para terminar

su dormancia y comenzar a crecer. Las cianobacterias usadas como inoculante, *Nostoc* sp. y *Tolypothrix* sp., no se encontraron en el primer muestreo, probablemente debido al método de plaqueo, en que bacterias que constituyen un bajo porcentaje de la flora total no aparecen. Por otro lado, las cianobacterias fijadoras de nitrógeno son ubicuas en los arrozales y el establecimiento de cepas introducidas como inoculante es infrecuente (Roger, 1995). Reddy *et al.*, (1986) señalaron que las posibles razones del fracaso de la inoculación incluirían propiedades del suelo, factores climáticos, factores bióticos y del inoculante.

La falta de supervivencia del inoculante y la presencia de cianobacterias nativas no indican necesariamente que la inoculación es inútil. Como la germinación de los acinetos es fotodependiente, el inoculante aplicado podría germinar mejor que los nativos mezclados con el suelo. En condiciones como las nuestras, donde el suelo ha permanecido seco durante un largo período y la población de cianobacterias nativas no es tan abundante como en suelos tropicales bajo sucesivos cultivos de arroz, el período de latencia puede demorar varias semanas. El potencial agronómico de la inoculación con cianobacterias nativas radica en acelerar el desarrollo de las mismas y lograr una mayor densidad más temprano en el ciclo de cultivo. Otra estrategia a seguir, sería poner el énfasis en prácticas que aumenten el crecimiento de las cianobacterias nativas adaptadas a este ambiente controlando los predadores o cambiando la forma de aplicar el fertilizante nitrogenado (Roger, 1995).

## CONCLUSIONES

- El arrozal estudiado presenta una población diversa de cianobacterias fijadoras de nitrógeno con predominio de los géneros *Anabaena* y *Nostoc*.
- Para todos los tratamientos ensayados la mayor cantidad de cianobacterias con heterocisto en la interfase suelo-agua se encontró a las 8 semanas de inundado el cultivo.
- La mayor densidad de cianobacterias se encontró en el tratamiento sin aplicación de nitrógeno y la aplicación de urea en cobertura disminuyó el número de cianobacterias.
- El inoculante utilizado no aumentó el número de cianobacterias presentes en las condiciones de este suelo y este año en particular.
- Se dispone de una colección liofilizada de cianobacterias nativas aisladas de un arrozal uruguayo que constituye la base de un cepario.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República e International Foundation for Science (IFS) Grant 2747-1.

Agradecemos a L. Gutiérrez, V. Picasso, M. Sallé y F. Milnitsky por su colaboración en la toma de muestras y a P. Díaz por su ayuda en el análisis estadístico. Agradecemos también al Ing. Agr. E. Brenzoni (Rizobacter Argentina S.A.) y al INIA Treinta y Tres (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) por permitirnos tomar las muestras de sus ensayos.

## BIBLIOGRAFIA

- BEGUM Z.N.T., MANDAL R., KHAN Z.U.M. and HOSSAIN M.Z. 1996. Prospect and potentiality of cyanobacteria as an alternative source of nitrogen fertilizer in Bangladesh rice cultivation. In: Biological nitrogen fixation associated with rice production. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 119-131.
- CARRERES R., GONZALEZ TOME R., SENDRA J., BALLESTEROS R., FERNANDEZ VALIENTE E., QUESADA A., NIEVA M. and LEGANES F. 1996. Effect of nitrogen rates on rice growth and biological nitrogen fixation. J. Agric. Sci. 127: 295-302.
- CASTENHOLZ R.W. 1984. SUBSECTION III. Order OSCILLATORIALES. SUBSECTION IV. Order NOSTOCALES. **En:** Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed. J.G. Holt-Baltimore: Williams y Wilkins, pp 1771-1799.
- DEAMBROSI E. 1998. **En:** Arroz. Resultados experimentales 1997-1998. Ed. INIA Treinta y Tres.
- GRANT I.F., ROGER P.A. and WATANABE I. 1985. Effect of grazer regulation and algal inoculation on photodependent nitrogen fixation in a wetland rice field. Biol. Fert. Soils 1:61-72.
- PROSPERI C., PONS S. M. and MAGGI E. 1996. Ecological aspects of cyanobacteria from the rice fields of Corrientes (Argentina). **En:** Biological nitrogen fixation associated with rice production. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 141-146.
- QUESADA A. and FERNANDEZ-VALIENTE E. 1996. Relationship between abundance of  $N_2$ -fixing cyanobacteria and environmental features of spanish rice fields. Microb Ecol. 32: 59-71.
- QUESADA A., LEGANES F. and FERNANDEZ-VALIENTE E. 1997. Environmental factors controlling  $N_2$  fixation in mediterranean rice fields. Microb. Ecol. 34: 39-48.
- REDDY P.M. and ROGER P.A. 1988. Dynamics of algal populations and acetylene-reducing activity in five rice soils inoculated with blue-green algae. Biol. Fert. Soils 6:14-21.
- REDDY P.M., ROGER P.A., VENTURA W. and WATANABE I. 1986. Blue-green algal treatment and inoculation had no significant effect on rice yield in an acidic wetland soil. Phil. Agri. 69: 629-632.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M. and STANIER R.Y. 1979. Generic assignement, strain stories and properties of pure culture of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1-61.
- RIPPKA R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. Methods in Enzimology 167: 2-27.
- ROEL A. 1999. Agroclimatología. Singulares variantes recientes. Arroz 17: 42-44
- ROGER P.A. et REYNAUD P.A. 1976. Dynamique de la population algale au cours d'un cycle de culture dans une rizière sahélienne. Rev. Écol. Sol, 13: 545-560.
- ROGER P.A. 1995. Biological  $N_2$ -fixation and its management in wetland rice cultivation. Fert. Res. 42: 261-276.
- ROGER P.A., REMULLA R. and WATANABE I. 1984. Effect of urea on the  $N_2$ -fixing algal flora in lowland rice at ripening stage. Int. Rice Res. Newsletter 9: 28
- ROGER P.A., SANTIAGO-ARDALES S., REDDY P.M. and WATANABE I. 1987. The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. Biol. Fertil. Soils 5: 98-105.
- ROGER P.A., JIMENEZ R. and SANTIAGO-ARDALES S. 1991. Methods for studying blue-green algae in ricefields: distributional ecology, sampling strategies, and estimation of abundance. IRRI Research Paper Series 150: 1-19.
- WATANABE A. and YAMAMOTO Y. 1971. Algal nitrogen fixation in the tropics. Plant Soil (Special Issue): 403-413.
- WATERBURY J.B. and RIPPKA R. 1984. SUBSECTION I. CHROCOCCALES. **En:** Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed. J.G. Holt-Baltimore: Williams & Wilkins, pp 1728-1746.
- YANNI Y.G. 1996. Contribution of cyanobacterization to rice growth and performance under different field stand densities and levels of combined nitrogen. **En:** Biological nitrogen fixation associated with rice production. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 133-139.
- YANNI Y.G. and SEHLY M.R. 1991. Rice performance and natural infection with blast (*Pyricularia oryzae* Cav.) under different algalization techniques and rates of fertilizer nitrogen. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 43-47.

# Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen

Pilar Irisarri \*, Susana Gonnet, Jorge Monza

*Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Av. E. Garzón 780, C.P. 12900 Montevideo, Uruguay*

Received 19 September 2000; received in revised form 7 March 2001; accepted 12 March 2001

## Abstract

It has been established that cyanobacteria play a vital role in the maintenance of flooded rice field fertility. To evaluate the potential use of nitrogen-fixing cyanobacteria as a natural biofertilizer for rice in Uruguay, the diversity, abundance and nitrogen fixing ability of these microorganisms were studied in the field and in the laboratory. The effect of urea fertilization on population density and diversity of heterocystous cyanobacteria was determined on a 3-year assay. The highest number of cyanobacteria,  $1.6 \times 10^4$  CFU  $m^{-2}$ , was found at the control 8 weeks after flooding. About 90% of the heterocystous cyanobacteria found in both treatments belong to the genera *Nostoc* and *Anabaena*. Maximal nitrogenase activity was reached after 12 weeks of flooding in both treatments, with an average of about  $20 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . To improve the understanding of the environmental factors that can limit nitrogenase activity in rice fields, two of the most abundant cyanobacteria isolates were tested for tolerance to combined nitrogen and two herbicides. In both isolates 0.2 mM ammonium inhibited nitrogenase activity after 24 h of culture. The addition of field-recommended doses of quinclorac and propanil affected oxygen photoevolution but nitrogenase activity was only inhibited by propanil. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Cyanobacteria; Biological nitrogen fixation; Rice fields

## 1. Introduction

Uruguay is the seventh largest rice exporting country in the world with a cultivated area that has nearly tripled in the last twenty years (Gamarra, 1996).

Flooded rice fields, like the Uruguayan ones, are a privileged niche for biological nitrogen fixation as they possess a variety of  $\text{N}_2$ -fixing systems (Roger, 1995). Diazotrophic cyanobacteria are the main contributors to photodependent  $\text{N}_2$  fixation in rice fields and among them, heterocystous cyanobacteria are quite ubiquitous (Sinha and Häder, 1996). They play a vital role in the maintenance and build up of soil fertility (Roger and Watanabe, 1986).

\* Corresponding author: Tel. + 598-2-309-7191; fax + 598-2-309-3004.

E-mail address: irisarri@fagro.edu.uy (P. Irisarri).



More than 50% of the nitrogen used by rice receiving nitrogen fertilizer derives from native soil nitrogen. The soil nitrogen pool is maintained through biological nitrogen fixation by organisms, heterotrophs and autotrophs, associated to rice plants or in the soil (Roger and Ladha, 1992).

Biological nitrogen fixation contribution to rice culture is up to 75 kg N ha<sup>-1</sup> per culture cycle with a media between 8 and 30 kg ha<sup>-1</sup> (Quesada et al., 1997). Most published data concern rice fields in Asia or Spain (Fernández-Valiente et al., 2000), which have hydrological characteristics and agricultural management that is quite different from Uruguayan ones. One of the differences is that our rice fields had a previous history of a three-year pasture or fallow, as the weeds do not allow sowing rice after rice (Gamarra, 1996). Therefore soils are dry over a long period before rice and flooding is established about four weeks after sowing.

Despite the economic importance of rice culture in Uruguay, little is known about the contribution of N<sub>2</sub>-fixation to the fertility of our rice fields. Nevertheless it is well known that the crop uses more nitrogen than that added as fertilizer (Deambrosi, 1999).

The fate of cyanobacteria in the rice field ecosystem depends on their ability to grow, colonize and survive. There are many factors limiting cyanobacterial growth including physical, chemical and biological ones (Sinha and Häder, 1996). Among the chemical stresses affecting cyanobacteria, it is well known that ammonium represses nitrogenase activity and heterocyst differentiation (Prosperi et al., 1992). Besides N fertilizer, other habitually employed agrochemicals in rice culture in our country are herbicides, and their effects on nitrogen fixation by native cyanobacteria are not known.

With the aim of evaluating the potential use of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria as natural biofertilizer for rice, the diversity and nitrogen fixing ability of these microorganisms were studied in a typical rice field of Uruguay. On the other hand, to improve the understanding of the environmental factors that can be limiting nitrogenase activity, two of the most abundant cyanobacterial native isolates were tested for tolerance to combined

nitrogen and to propanil and quinclorac, two herbicides used in Uruguay.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

Field experiments were conducted in three consecutive crop seasons (1997–98, 98–99 and 99–00) in 'Paso de la Laguna', an experimental field of Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) in Treinta y Tres, Uruguay. The soil belongs to the albic natraqualf group (USDA, 1998), pH 5.3, 1.51% organic-C, 6 mg kg<sup>-1</sup> available P (Bray 1) and 0.26 cmol kg<sup>-1</sup> K. A 3-year pasture preceded this culture, which was sowed after reduced summer tillage. Basal N and P doses (10 and 52 kg ha<sup>-1</sup> respectively) were applied as a single application at sowing. Treatments consisted of two levels of nitrogen, 0 (control) and 70 kg ha<sup>-1</sup>, supplied as urea when flooding was established. Field trials were performed in plots that received independent irrigation. Plots of 13.2 m<sup>2</sup> were seeded with rice variety El Paso 144 (150–155 days' cycle) at 200 kg ha<sup>-1</sup>.

Herbicides propanil and quinclorac (BASF Uruguay S.A.) at 2 L ha<sup>-1</sup> were applied previous to flooding. Rice was flooded 30 days after sowing to a depth of about 10 cm. The land was drained 2 weeks before harvesting.

### 2.2. Sampling and counting of cyanobacteria

Three times during the culture cycle, water samples and soil cores of the top 0.5 cm were taken to determine planktonic and benthic cyanobacteria. Ten samples of the same treatment were mixed and kept in the dark at 4 °C until processing. Water and soil suspension dilutions were plated onto agar containing nitrogen-free BG11 medium (Allen, 1968). Plates were incubated for 4 weeks at 28 ± 2 °C with continuous illumination (50 μE m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). Heterocystous strains were classified into broad taxa according to morphological features observed directly on the material growing in Petri dishes according to Roger et al. (1987).



Sampling dates corresponded to the following growth stages of rice:

1. Tillering (main shoot and three tillers).
2. Booting (boots swollen)
3. Grain filling

### 2.3. Nitrogenase activity in the field

The in situ acetylene reducing activity (ARA) method with an incubation device similar to that designed to minimize problems related to slow gas diffusion by Quesada et al. (1989) was used. Assays were performed at three sampling periods for three consecutive years. At each sampling period, 3 days at 09:00 h, four assay chambers were placed in each plot between the rows of plants and in places without visually observable cyanobacteria. Two controls were included: one of ethylene production by soil (without acetylene) and the other kept in darkness covered with an aluminium foil for 14 h to estimate nitrogen fixation by heterotrophs. 10% of the air inside each chamber was substituted by acetylene. Aliquots of the gas phase were taken with prevacuated Vacutainer<sup>®</sup> tubes after 4 h of incubation with acetylene. Ethylene concentrations were determined in a gas chromatograph.

### 2.4. $\text{NH}_4^+$ -N soil analysis

Fifteen subsamples of soil from each plot were dried and crushed to pass through a 1 mm sieve. Soil ammonium content was determined at each sampling period using the indophenol blue method (Keeney and Nelson, 1982) after extraction with 2 M KCl and filtration.

### 2.5. Statistical analysis

Plots were laid in a two-block design, with four replicates per treatment.

Since field measurements of cyanobacteria population and nitrogenase activity are known to have an aggregative distribution that approximates a log-normal pattern in rice fields (Roger et al., 1991), the residuals of our results were analysed. The distribution of residuals was not homogenous and was normalised using the loga-

rithms of the original data + 1 (to avoid the problems of zeros) for the statistical analysis. Analysis of variance as well as correlation were performed, where appropriate, as indicated in the text.

### 2.6. Laboratory assays

*Nostoc* BI42 and *Anabaena* BI46 were purified and isolated by dilution and plating from soil samples of the same rice fields where in situ nitrogenase activity was assayed. Cultures were grown shaking them under a constant light intensity of 120  $\mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$ . Stock cultures were grown in N-free BG11 medium buffered at pH 7.6 with 2.5 mM HEPES.

Data in the figures and tables are the means of three independent experiments with duplicate cultures and samples within each experiment.

#### 2.6.1. Nitrogenase activity

To determine the response to the addition of ammonium, acetylene reduction assay was performed in 25 mL aliquots of cell suspensions, placed in 50 mL vials after 24 h of 0.05 and 0.5 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  addition to the media. The incubation time with acetylene was 30 min. Nitrogenase activity was expressed as  $\mu\text{mol ethylene mg}^{-1}$  protein  $\text{h}^{-1}$ . Protein content was determined using the Lowry method (Lowry et al., 1951).

The effect of herbicides on nitrogenase activity was determined 3 and 24 h after the herbicide addition. The herbicides Propanil BASF 480 (active principle 3,4-dichloropropionanilide) and Facet SC (active principle quinclorac, 3,7-dichloro-8-quinolinecarboxylic acid) were kindly supplied by BASF Uruguaya S.A.

#### 2.6.2. Photosynthetic activity

Photosynthesis was measured as  $\text{O}_2$  evolution with a Clark-type  $\text{O}_2$  electrode (Hansatech Instruments Ltd.). Two ml aliquots of cell suspensions were placed in a 27 °C controlled cuvette and illuminated with a quantum flux density of 400  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . For chlorophyll determination, samples of washed cells were extracted with methanol overnight, read at 665 nm and calculated as described by Marker (1972).

### 3. Results

#### 3.1. Diversity of cyanobacteria

Diversity and population density of heterocystous cyanobacteria among a urea fertilized treatment and a control without nitrogen application were compared during 3 years. More than 89% of the heterocystous cyanobacteria found in the soil of both treatments every year belonged to the genera *Nostoc* and *Anabaena* (Table 1). The other genera present at low density were *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Scytonema* and *Tolypotrix*. Abundant non-heterocystous cyanobacteria belonging to the order Chroococales, as *Gloethece* (Waterbury and Rippka, 1984) and *Oscillatoriales*, corresponding to the genera *Lynghya*, *Oscillatoria* and *Pseudoanabaena* (Castenholz, 1984) were found in all the counts performed. These cyanobacteria were almost the only ones present at tillering when heterocystous cyanobacteria were less than 100 CFU cm<sup>-2</sup> for both treatments.

Macroscopic colonies of *Gloeotrichia* sp. of about 9 mm diameter appeared at grain filling in

both treatments and in all years. *Gloeotrichia* colonies were also epiphytic over dry leaves of rice and weeds, and they disappeared 2 weeks later.

Edaphic cyanobacterial abundance showed an almost similar pattern in all the years, with maximum values at booting stage (Table 1).

The number of heterocystous cyanobacteria in the fertilized treatment was significantly smaller than in the control (Table 1).

Heterocystous cyanobacteria were present in all soil samples, but in water samples only unicellular and filamentous cyanobacteria without heterocystous were found. Only in the last studied year, 465 heterocystous CFU ml<sup>-1</sup> were recorded in water for the control and 30 CFU ml<sup>-1</sup> for the 70 kg N-treatment at booting stage of rice.

#### 3.2. Acetylene reduction activity in the field

The contribution of heterotrophic nitrogen fixing organisms to nitrogen fixation was negligible, with average values between 0 and 1.5 μmol m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

Chambers without acetylene placed at each plot showed average background ethylene concentra-

Table 1

Total heterocystous cyanobacterial population and the more abundant cyanobacterial types

Year	Nitrogen treatment (kg N ha <sup>-1</sup> )	Growth stage <sup>a</sup>	Heterocystous cyanobacteria (CFU × 10 <sup>2</sup> cm <sup>-2</sup> of soil)		
			<i>Nostoc</i>	<i>Anabaena</i>	Total <sup>b</sup>
1997	0	2	16.3	0.9	17.6
		3	9.1	1.0	12.0
	70	2	34.0	3.5	40.0
		3	4.8	0.6	6.1
1998	0	2	10.0	150.0	160.0
		3	8.0	0.0	28.5
	70	2	55.0	35.0	100.0
		3	3.0	0.0	6.5
1999	0	2	18.1	1.3	19.4
		3	20.5	0.8	21.5
	70	2	6.1	0.3	6.4
		3	1.7	0.7	1.7

<sup>a</sup> 2 and 3 correspond to booting and grain filling.

<sup>b</sup> Analysis of variance was performed on total CFU (colony forming units) transformed to log of *x*. The table gives backtransformed values. Heterocystous cyanobacterial population was different among treatments ( $p = 0.03$ ) and among growth stages ( $p = 0.001$ ).

Table 2  
Effect of urea fertilization on grain yield and in situ nitrogenase activity at two sampling periods during three crop seasons

Year	Growth stage <sup>a</sup>	Nitrogenase activity ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) <sup>b</sup>		Grain yield ( $\text{ton ha}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	
		0 kg N ha <sup>-1</sup>	70 kg N ha <sup>-1</sup>	0 kg N ha <sup>-1</sup>	70 kg N ha <sup>-1</sup>
1997	2	8.5	35.9	6387 $\pm$ 55	7658 $\pm$ 728
	3	78.3	71.8		
1998	2	5.9	2.9	8324 $\pm$ 381	7939 $\pm$ 195
	3	8.7	4.8		
1999	2	6.9	2.8	6718 $\pm$ 240	8686 $\pm$ 224
	3	66.0	6.4		

<sup>a</sup> 2: booting stage; 3: grain filling.

<sup>b</sup> Analysis of variance was performed on ARA data transformed to log of  $(x+1)$  and were non significantly different. The table gives backtransformed values.

<sup>c</sup> Data are mean values  $\pm$  standard deviation. Grain yield was significantly different for N treatment ( $p < 0.05$ ).

tions lower than  $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , the estimated detection limit of the technique.

Statistical analysis of data from the first year by two-way analysis of variance (morning or afternoon determination and treatment) showed no significant difference between the moment of ARA measurement, so in the following years the assays were performed at 9 a.m.

At tillering, every year, there was no detectable acetylene reduction. The average acetylene reduction rates in all treatments and in the three analysed years were not higher than  $80 \mu\text{mol ethylene m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , ranging from 0 to  $570 \mu\text{mol ethylene m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (Table 2).

Statistical analysis of nitrogenase activity for nitrogen treatment sliced by year and by phenological state of rice showed significant differences only for the last year and growth stage considered ( $p < 0.02$ ).

Heterocystous cyanobacterial abundance and photodependent ARA were not correlated.

Ammonium soil content varied among 11 to  $47 \mu\text{g kg}^{-1}$  and was not significantly different for the crop seasons and sampling dates studied (data not shown). There was no correlation between soil ammonium content and ARA.

Seventy kilograms of nitrogen fertilizer enabled

a higher rice yield to be obtained without significantly affecting N fixation (Table 2). No correlation was found between biological nitrogen fixation and grain yield in control plots and in plots with urea.

### 3.3. Effect of herbicides on photosynthesis

The effect of propanil and quinclorac over the photosynthetic activity (oxygen production) of *Nostoc* BI46 and *Anabaena* BI42 isolates are shown in Fig. 1. The herbicides were directly added to the oxygen electrode chamber so the results of the assay confirmed the fast response of photosynthesis to herbicides.

Propanil addition (Fig. 1A) suppressed the oxygen evolution to about 78% at  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  and 91% at  $1 \text{ mg l}^{-1}$  in *Nostoc* culture. In *Anabaena* the suppression of photosynthetic oxygen evolution by propanil, reached values of 55% at  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  and 85% at  $1 \text{ mg l}^{-1}$ .

Quinclorac addition slowed down oxygen production at lower percentages than propanil (Fig. 1B). In *Anabaena* with 0.5 and  $1 \text{ mg l}^{-1}$  the decrease was 31 and 41%, respectively. In *Nostoc*, both concentrations of quinclorac reduced photosynthetic oxygen evolution by 45%.

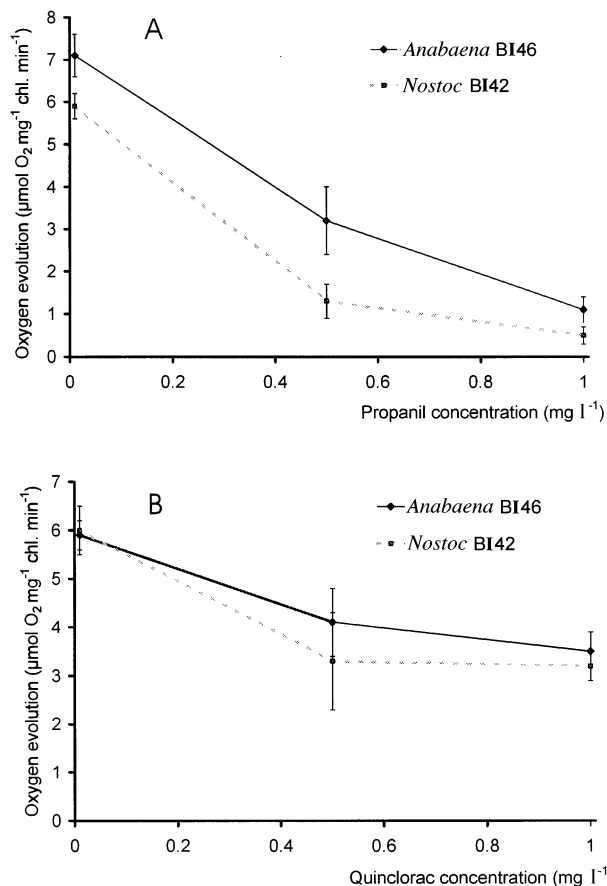


Fig. 1. Effect of different propanil (A) and quinclorac (B) concentrations on oxygen photoevolution in *Nostoc* BI42 and *Anabaena* BI46. Bars indicate the standard deviation.

#### 3.4. Effect of herbicides on nitrogenase activity

With the addition of propanil, nitrogenase activity presented a different pattern for *Nostoc* and *Anabaena* isolates (Table 3). ARA decreased by more than 40% in *Nostoc* culture after 3 h of incubation with 0.5 mg l<sup>-1</sup> of propanil. The rate of ARA remained similarly inhibited after 24 h of incubation with this herbicide and higher concentrations of propanil (2 mg l<sup>-1</sup>) did not produce higher inhibition.

In *Anabaena*, ARA inhibition with propanil at 0.5 mg l<sup>-1</sup> was as drastic as for *Nostoc* after 3 h and continued decreasing to 64% after 24 h. Higher concentrations of propanil, between 1 and

Table 3

Effect of different propanil concentrations on nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice fields

Propanil (mg l <sup>-1</sup> )	Nitrogenase activity (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> mg <sup>-1</sup> prot. h <sup>-1</sup> )			
	<i>Nostoc</i> BI42		<i>Anabaena</i> BI46	
	3 h	24 h	3 h	24 h
0	37 ± 5	38 ± 6	40 ± 2	42 ± 3
0.5	20 ± 4	23 ± 5	24 ± 2	15 ± 3
1.0	18 ± 5	15 ± 3	5 ± 3	6 ± 2
2.0	19 ± 4	14 ± 2	3 ± 1	2 ± 1

Values are means of four replicates ± standard error.

2 mg l<sup>-1</sup>, reduced *Anabaena* nitrogenase activity to only 10% of the control.

Quinclorac did not slow down nitrogenase activity at 3 or 24 h and up to 2 mg l<sup>-1</sup> in both isolates (results not shown). Moreover, ARA inhibition caused by propanil was not worse when both herbicides were added together, 1 mg l<sup>-1</sup> of propanil plus 0.5 mg l<sup>-1</sup> of quinclorac (data not shown).

#### 3.5. Effect of combined nitrogen on nitrogenase activity

Nitrogenase activity, measured immediately after the addition of ammonium at 0.05, 0.2, 0.5 and 1 mM, was not different to the control (data not shown). However, rates of ARA were significantly lower after 24 h of culture in the presence

Table 4

Effect of different ammonium concentrations on nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice fields

Ammonium (mM)	Nitrogenase activity (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> mg <sup>-1</sup> prot. h <sup>-1</sup> )	
	<i>Nostoc</i> BI42	<i>Anabaena</i> BI46
0.00	40 ± 6	54 ± 10
0.05	29 ± 5	38 ± 8
0.20	18 ± 2	33 ± 3
0.50	5 ± 1	18 ± 2
1.00	3 ± 1	6 ± 1

Values are the means of four replicates ± standard error.

of ammonium from 0.2 mM (Table 4). With the highest assayed concentration of ammonium, the inhibition range was of the order of 90% after 24 h incubation (Table 4).

## 4. Discussion

### 4.1. Heterocystous cyanobacterial population

The average heterocystous cyanobacterial density in the control,  $2.8 \times 10^3$  CFU  $\text{cm}^{-2}$  of soil, was lower than that reported for rice fields in Spain (Fernández-Valiente et al., 2000, 1997; Quesada et al., 1997) or at IRRI in about 200 measurements (Roger and Ladha, 1992). The initially slightly acidic pH of the soil could affect cyanobacterial growth and favour eukaryotic algal development (Roger et al., 1980). Green algae and aquatic weeds can compete for light with cyanobacteria and could explain the low indigenous density of viable propagules.

Most heterocystous cyanobacteria were *Nostoc* genus, which is known for its ability to withstand desiccation. The predominance of *Nostoc* spp. in most of the soil samples happens to be a common observation for rice fields (Begum et al., 1996). The dominance of mucilaginous strains like *Nostoc* and *Gleotrichia* in the soil or as blooms, indicates that dryness and grazing may be important limiting factors for cyanobacterial growth (Roger et al., 1987). A high number of snails (*Planorbis* sp.) were present at booting and grain filling.

The addition of nitrogen fertilizer has been shown to decrease cyanobacterial growth as in our results, but the inhibition might be mostly indirect (Roger, 1988).

### 4.2. In situ nitrogenase activity

No consistent temporal patterns in ARA determined in situ were evident throughout, although on average, the highest values were observed at the last sampling date and the lowest at tillering state. El Paso 144 is a rice variety with erect leaves which allows the light to reach the soil surface with an appropriate intensity until the end

of the culture cycle. At the beginning of the crop season, the natural cyanobacteria population might be low and several weeks need to pass before it can make a significant contribution to  $\text{N}_2$  fixation.

The modest nitrogen fixation rate recorded could be considered as the minimum ARA, since the incubation chambers were always placed where no apparent cyanobacterial bloom was present. The high variability of ARA registered, confirmed the recognised limitations of the method (Roger and Ladha, 1992). A gross input estimation of  $1 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ crop}^{-1}$  by biological fixation can be made for the control, assuming 80 days of detectable ARA.

It is accepted that ammonium inhibits nitrogenase activity. The lack of significance of nitrogen treatment in most of the years considered, suggests that nitrogen fixation in rice fields is governed by other factors and not only by nitrogen fertilizer. It has been reported that after fertilization, nitrogen in the floodwater returns to its original concentration within a few days (Fernández-Valiente et al., 1997).

Measurements of  $\text{NH}_4^+$ -N were intended to reflect the amount of nitrogen readily available for plants' and microorganisms' use at the time of sampling. This parameter includes mineral nitrogen in both the solution and the exchange complex that can readily replace N removed from solution (Westcott and Mikkelsen, 1987).  $\text{NH}_4^+$ -N was expected to be a better indicator of the combined nitrogen affecting nitrogenase activity than nitrogen applied as fertilizer at sowing, but this was not the case.

The lack of correlation between heterocystous cyanobacterial abundance and photodependent ARA would indicate little contribution to ARA by this group of bacteria. However, the low accuracy of the counting method, which does not typically represent the total population (Roger et al., 1987), could contribute to the weak correlation between ARA and cyanobacterial abundance. The fact that non-heterocystous cyanobacteria may show high nitrogen fixation rates at moderate light intensities, and that anoxygenic phototrophic nitrogen fixing bacteria could be involved (Quesada et al., 1997), must be considered.

The lack of correlation between ARA and yield may indicate that fixed nitrogen was scarcely used by the crop. Our results do not indicate that it is possible to reduce N-fertilizers due to N<sub>2</sub> fixed by cyanobacteria without affecting rice productivity.

Native cyanobacterial strain enrichment appears as an alternative or supplementary nitrogen input to our rice field ecosystem. The effect of cyanobacteria inoculation could be to shorten the time necessary for local adapted strains to multiply and colonize the soil efficiently (Balandreau and Roger, 1996). Since spore germination is photodependent, inoculated propagules applied on the soil surface might germinate better than indigenous propagules mixed with the soil. Inoculation may enable cyanobacterial biomass development and later mineralization, therefore rice could benefit from the nitrogen fixed during the crop cycle.

#### 4.3. Effect of herbicides and combined nitrogen

Quinclorac and propanil are two herbicides commonly used in Uruguay to control *Echinochloa* spp. at 1.5 and 10 l per hectare respectively (Gamarra, 1996). Sensitivity of cyanobacteria to herbicides varies according to the species and the kind of herbicide, but in general they are quite sensitive to herbicides (Leganés and Fernández-Valiente, 1992).

It is known that propanil inhibits the Hill reaction and it has also been reported that photosynthesis in cyanobacteria like *Anabaena cylindrica*, *Tolypothrix tenuis* and *Nostoc entophyllum* at 100 mg l<sup>-1</sup> is inhibited (Singh and Tiwari, 1988). Assuming a floodwater layer of 10 cm depth, the final concentrations of quinclorac and propanil present in the field are 0.2 and 0.5 mg l<sup>-1</sup> respectively. However, when the herbicides are applied, concentrations may be higher on dry soil where most cyanobacteria are dormant.

The exact mode of action of quinclorac is not completely known, although several tests have shown its auxin-type character (Berghaus and Wuerzer, 1987). Inhibition of photosynthesis by quinclorac is lower than propanil inhibition, which may explain the fact that quinclorac did not inhibit nitrogenase activity after 24 h; mean-

while the herbicide may be metabolized by these cyanobacteria.

Besides ATP, nitrogen fixation requires also a source of reducing power, which is dependent on a supply of carbon compounds from the vegetative cells (Gallon and Chaplin, 1988). Inhibition of nitrogen fixation could be a consequence of inhibition of photosynthesis (Leganés and Fernández-Valiente, 1992) related to the lack of reducing agent pools.

The effect of propanil was less marked in *Nostoc*, which was the most frequent genus found in the rice field studied. Anyway, the fact that quinclorac did not affect nitrogenase activity should be considered when herbicides are recommended for rice.

The inhibition of nitrogenase activity in the presence of ammonium (Table 4) was similar to the one observed by Prospero et al. (1992) after 48 h of incubation with 0.4 mM ammonium. High ammonium concentrations (0.5–1 mM) can be expected in rice fields when fertilizer is added, but it is diluted or consumed in a short time, particularly if it is applied before flooding as in our conditions.

#### Acknowledgements

Financial assistance was from CSIC (Universidad de la República), IFS (International Foundation for Science, Grant C/2747-1) and PROBIDES. We thank Dr A. Quesada for his kind help and suggestions, L. Gutiérrez and P. Díaz for their assistance with the statistical analysis and E. Deambrosi (INIA Treinta y Tres) for providing rice yield data and agronomic technical support.

#### References

- Allen, M.M., 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phicol.* 4, 1–3.
- Balandreau, J., Roger, P., 1996. Some comments about a better use of biological nitrogen fixation in rice cultivation. In: Rahman, M., Podder, A., van Hove, C., Begum, Z.N.T., Heulin, T., Hartmann, A. (Eds.), *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*, pp. 1–12.

- Begum, Z.N.T., Mandal, R., Khan, Z.U.M., Hossain, M.Z., 1996. Prospect and potentiality of cyanobacteria as an alternative source of nitrogen fertilized in Bangladesh rice cultivation. In: Rahman, M., Podder, A., van Hove, C., Begum, Z., Heulin, T., Hartmann, A. (Eds.), *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production*, pp. 119–131.
- Berghaus, R., Wuerzer, B., 1987. The mode of action of the new experimental herbicide quinclorac (BAS 514 H). In: *Asian-Pacific Weed Science Society 11th Conference*, pp. 81–87.
- Castenholz, R.W., 1984. Subsection I. Order Oscillatoriales. Subsection IV. Order Nostocales. In: Holt, J.G. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1771–1799.
- Deambrosi, E., 1999. In: *Arroz, Resultados Experimentales 1998–1999*. INIA (Ed.), p. 14.
- Fernández-Valiente, E., Quesada, A., Prosperi, C., Nieva, M., Leganés, F., Ucha, A., 1997. Short- and long-term effects of ammonium on photodependent nitrogen fixation in wetland rice fields of Spain. *Biol. Fertil. Soils* 24, 353–357.
- Fernández-Valiente, E., Ucha, A., Quesada, A., Leganés, F., Carreres, R., 2000. Contribution of N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from <sup>15</sup>N-labelled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant and Soil* 221, 109–114.
- Gallon, J.R., Chaplin, A.E., 1988. Nitrogen fixation. In: Broughton, W. (Ed.), *Nitrogen Fixation*, vol. 1. Clarendon Press, Oxford, pp. 147–173.
- Gamarra, G., 1996. In: *Arroz, Manual de Producción*. Hemisferio Sur (Ed.), Montevideo, Uruguay.
- Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982. Nitrogen-inorganic forms. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods and Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, pp. 674–676 *Agronomy Monograph* 9.
- Leganés, F., Fernández-Valiente, E., 1992. Effects of phenoxy-acetic herbicides on growth, photosynthesis and nitrogenase activity in the cyanobacteria from rice fields. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 130–134.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193, 265–275.
- Marker, A.F.M., 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of pheophytin. *Freshw. Biol.* 2, 361–385.
- Prosperi, C., Boluda, L., Luna, C., Fernández-Valiente, E., 1992. Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice-fields. *J. Appl. Phycol.* 4, 197–204.
- Quesada, A., Leganés, F., Fernández-Valiente, E., 1997. Environmental factors controlling N<sub>2</sub> fixation in Mediterranean rice fields. *Microb. Ecol.* 34, 39–48.
- Quesada, A., Sánchez-Maeso, E., Fernández-Valiente, E., 1989. New incubation device for in situ measurements of acetylene-reducing activity in rice fields. *J. Appl. Phycol.* 1, 195–200.
- Roger, P.A., 1988. Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. In: *International Symposium: Biological N<sub>2</sub> Fixation Associated with Rice Production and Rice Culture*, Cuttak, India, pp. 1–22.
- Roger, P.A., 1995. Biological N<sub>2</sub> fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertil. Res.* 42, 261–276.
- Roger, P.A., Ladha, J.K., 1992. Biological N<sub>2</sub> fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant Soil* 141, 41–55.
- Roger, P.A., Watanabe, I., 1986. Technologies for using biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage and limiting factors. *Fertil. Res.* 9, 39–77.
- Roger, P.A., Santiago-Ardales, S., Reddy, P.M., Watanabe, I., 1987. The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol. Fert. Soils* 5, 98–105.
- Roger, P.A., Jiménez, R., Santiago-Ardales, S., 1991. Methods for studying blue-green algae in rice fields: distributional ecology, sampling strategies, and estimation of abundance. *ORSTOM, IRPS* 150, 3–19.
- Singh, L., Tiwari, D., 1988. Effects of selected rice-field herbicides on photosynthesis, respiration and nitrogen assimilating enzyme systems of paddy soil diazotrophic cyanobacteria. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31, 120–128.
- Sinha, R.P., Häder, D.P., 1996. Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 64, 887–896.
- USDA (United States Department of Agriculture) Natural Resources Conservation Service, 1998. *Keys to Soil Taxonomy*, 8th edition.
- Waterbury, J.B., Rippka, R., 1984. Subsection I. Chroococcales. In: Holt, J.G. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1728–1746.
- Westcott, M.P., Mikkelsen, D.S., 1987. Comparison of organic and inorganic nitrogen sources for rice. *Agron. J.* 79, 937–943.

## Chapter 16

# Role of Cyanobacteria As Biofertilizers: Potentials and Limitations

Pilar Irisarri

### *INTRODUCTION*

Biofertilizers are preparations containing viable forms of beneficial microorganisms intended for seed or soil application. Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic bacteria, and some of them are able to fix dinitrogen. They have inhabited much of the surface of the earth for billions of years and today they are responsible for a significant amount of biological nitrogen fixation (BNF). Cyanobacteria's trophic independence made them suitable for use as biofertilizers. Cyanobacteria are widely distributed organisms all over the world and can be found in extreme habitats, from hot springs to arctic regions. Among the ecosystems in which they can be found, wet soils provide an ideal environment for cyanobacteria to grow.

The existence of an agronomic potential for cyanobacteria in rice cultivation was recognized by De (1939), who attributed the natural fertility of tropical rice fields to BNF by those organisms. Since then, long-term fertility experiments and nitrogen-fixation measurements have confirmed the importance of cyanobacteria and other nitrogen-fixing organisms in maintaining moderate but consistent rice production in fields receiving no nitrogen fertilizer (Roger, 1991).

Nitrogen (N) is one of the most important crop nutrients, and in countries of the developing world nitrogen fertilizers are not always available or are so only to a limited extent. Increased use of chemical fertilizer is also contributing to the degradation of the biological properties of the soil and, indirectly, environmental conditions. Thus, some ways and means must be developed to minimize the use of chemical fertilizers. Energy crises com-

---

I am grateful to Dr. P. A. Roger who sent me his bibliographical references. The previously unpublished results from our laboratory mentioned in this chapter were made possible by grants from IFS (C/2747) and INIA-FPTA N° 108.



pelled us to think about using renewable natural resources and BNF. Cyanobacteria contribution to soil fertility in many agroecosystems deserves more attention due to their ecological and economical advantages. Use of certain nitrogen-fixing cyanobacteria as partial substitutes for chemical fertilizer seems to be one of the most important approaches to BNF technology. Hence, cyanobacteria study has been pursued from both theoretical and applied perspectives.

It is well established that the best results of inoculation with cyanobacteria are obtained when indigenous species or strains are applied; exotic species are hardly able to survive when introduced to a habitat of tough competition and zooplankton predation, so they are generally eliminated.

The main limiting factor for a technology allowing the enhancement of the presence of indigenous cyanobacteria is certainly the lack of data about the ecology and environmental elements promoting or modulating the growth increase in biomass. Some limitations for its use as a biofertilizer has been discussed in the present work.

#### **CURRENT STATUS OF CYANOBACTERIAL USE AS BIOFERTILIZERS**

Earlier reports indicated that cyanobacteria were not abundant in rice fields and so it was justified to inoculate. The effects of soil inoculation with cyanobacteria on rice yield were first reported by Watanabe et al. (1951), with a 25 percent increase in yield after inoculation of a poorly drained paddy with *Tolypothrix tenuis*.

Floating gelatinous colonies of *Nostoc* were added to some fields in China, with populations developed in ponds and released into paddy fields when the rice was planted (Whitton and Roger, 1989).

Studies on inoculation with *Tolypothrix tenuis* have been discontinued in Japan, but subsequently there have been many reports from India and a limited number from other countries such as the Philippines, Burma, Thailand, Vietnam, Russia (Hashem et al., 1996), and Egypt (Yanni, 1996).

In India, where the technique of "algalization" (inoculation with cyanobacteria) was developed, cyanobacteria were provided to rice farmers by the All India Coordinated Project on Algae (Venkatamaran, 1981).

In Thailand, since 1992, the pilot plant at the Technopolis has supplied more than 20,000 tons of biofertilizer to the Department of Agricultural Extension. The technology is now being transferred from the ministry to the private sector for commercial production.

Most published data of inoculation with cyanobacteria refer to tropical rice fields, which are different in characteristics and agricultural manage-

ment from temperate ones. BNF is far more diverse and complex in the tropics than under temperate conditions (Balandreau and Roger, 1996). Assays of cyanobacterial inoculation in temperate climates were performed in the United States (Reynaud and Metting, 1988), Spain (Fernández-Valiente et al., 1996), Italy, Argentina (Zaccaro, 2000), and Uruguay (Irisarri et al., 1999).

Rice grows in flooded conditions during part of all the cropping period (lowland rice or deepwater rice) in about 88 percent of rice land (Roger, 1995). Information is scarce about the use of cyanobacteria as a biofertilizer for nonflooded cultures. However, Alfassi et al. (1997) found that *Nostoc commune* and *Anabaena cylindrica* could supply wheat plant (in pots) with atmospheric nitrogen to maintain its vegetative growth.

### AVAILABILITY OF FIXED NITROGEN TO RICE PLANTS

The extent to which cyanobacteria may contribute to the N requirements of the rice crop is determined by a number of factors, the more obvious including the standing crop, the rate of nitrogen fixation per unit area, the turnover of the fixed nitrogen, and the extent to which any N released becomes available to the rice plant (Whitton and Roger, 1989).

Nitrogen fixed by cyanobacteria may become available to rice plants only after its release into their surroundings, by mineralization of their intracellular content, and/or as extracellular products. So it was supposed that a successful setup of desired cyanobacteria in the rice fields would be a source of slow release of nitrogen according to plant demands.

Some studies using  $^{15}\text{N}$  have shown that the nitrogen fixed by the cyanobacteria is actually taken up by the crop plants. When fresh *Nostoc* inoculum, composed mainly of vegetative cells, was incorporated to the soil, about 38 percent of the  $^{15}\text{N}$  was recovered in the first crop instead of 28 percent when dried material was used (Tirol et al., 1982). This pot experiment demonstrated that cyanobacterial N was less available than ammonium sulfate for the first crop. But for the other two crops in the same assay, its availability was very similar, indicating the slow release of cyanobacterial nitrogen, a finding that agrees with the cumulative effect of inoculation. However, its very low C:N ratio (from 5:1 to 6:1) gave a better N availability than that of organic fertilizers such as farmyard manure.

Ghosh and Saha (1997) reported that inoculation significantly increased the release of inorganic N either in soil or in soil solution but such increase rarely exceeded 4 percent of total N gained in the soil system during the vegetative growth stages of the rice plant, when the nutritional requirements of the plants are at their maximum. However, the same authors reported that



inoculation caused an increase in nitrogen uptake by the grain (30 percent) and in total uptake when urea was not applied. Inoculation improved the N status of soil by nearly ten times more than that utilized by the crop. These results indicated a transformation of a very small fraction of cyanobacterial fixed N<sub>2</sub> to the plant-available form in the soil system during the vegetative growth period of the crop.

Saha and Mandal (1980) observed that most of the residual N from cyanobacteria remaining in wet soil after the crop harvest did not persist with air drying of the soil. In other assays with cyanobacterial N labeled with <sup>15</sup>N, it was mineralized quickly enough to be available during the growing season of a rice crop (Thind and Rowell, 1999). Depending on field conditions, cyanobacteria may have a role in assimilating nitrogen and protecting it from being lost as well as being a major driving force for NH<sub>3</sub> volatilization through diurnal increases in pH. Cyanobacteria may also cause N loss through stimulation of nitrification-denitrification processes as they affect the depth of the aerobic soil layer through their O<sub>2</sub> input, but this needs confirmation (Mandal et al., 1999).

### **CULTIVATION OF CYANOBACTERIA FOR BIOFERTILIZER**

The basic principle is to grow cyanobacteria using natural sunlight under conditions simulating the rice field. The open-air soil culture of inocula is simple and of low cost but has climatic limitations. It was estimated that a 2 m<sup>2</sup> tray might produce enough cyanobacteria to inoculate 1 ha in 2 to 3 months under sunny summer conditions (Roger, 1995).

In India, farmers multiplied the inoculum in shallow tanks with a thin layer of soil covered by water and superphosphate. The "starter culture" recommended was a soil-based mixture of *Aulosira*, *Tolypothrix*, *Scytonema*, *Nostoc*, *Anabaena*, and *Plectonema*. A copious growth of the inoculated species was expected in a week or two. The capacity of these organisms to stand desiccation made it possible to preserve the product in a sundried form. Under such culture conditions, Roger et al. (1987) observed that the final amount of individual strains in the algal flakes was unpredictable. Soil-based inocula were most frequently unbalanced and generally dominated by one or two strains, mostly a *Nostoc*. They suggested that a suitable method for producing a multistrain balanced inoculum of known quality would be to produce monostrain inocula of various strains, evaluate their concentrations after drying, and mix them according to the colony forming units (CFU) contained to obtain a balanced mixture.

In a two-year assay in Uruguay, fresh laboratory-produced inocula could not proliferate in the field, and inocula produced in tanks with soil and wa-

ter presented less than 1 percent of heterocystous cyanobacteria. In Japan, nurturing inoculum growth was often difficult (Grant et al., 1986). Roger and Kulasooriya (1980) explained how to produce inoculum under artificially controlled conditions, but large-scale biofertilizer production under these conditions seems difficult to accomplish.

The efficiency of inoculum can be increased if it contains a heavy load of the perennating bodies such as akinetes and hormocysts. Many species of *Anabaena* and *Nostoc* form a long chains of spores, and sometimes the entire trichome gets transformed into spores. A culture containing such organisms will multiply faster when inoculated into the field (Hori et al., 2002).

Fresh inoculum applied at a high density might be more efficient than a dry soil-based inoculum to provide nitrogen to the current crop (Roger, 1991).

Various inert supports have been tested for growth and conservation of inocula—pumice stone, sand, porous gravel, synthetic sponge blocks (2 to 4 cm)—and the material efficiency was verified even after two years of storage (Roger et al., 1987).

A multivariate analysis of data from West African sites (Reynaud and Roger, 1978) showed that the best time for inoculation was at the beginning of tillering.

### **INOCULATION AND CROP YIELD**

Inoculation with cyanobacteria has failed to increase rice yield consistently (Roger et al., 1993; Watanabe, 1986), which may explain why farmers have not adopted this technology. In an analysis of 634 experiments, Balandreau and Roger (1996) reported yield increases after inoculation. Yet in most experiments, the only variable measured was grain yield (Reddy and Roger, 1988); therefore, reasons for the presence or absence of a yield increase after cyanobacteria inoculation are poorly understood.

Yanni's study (1996) of inoculation with cyanobacteria in Egypt resulted in a yield increase of around 10 percent. In a two-year field assay in Uruguay, where rice seeds are sown in dry soil and followed by three years of forage species culture, grain yield was unaffected by inoculation but the number of heterocystous cyanobacteria was not different from the inoculated plots. The amount of total nitrogen in the soil did not vary at the end of the crop season. These results were obtained using inocula produced in the laboratory with the three more abundant isolates, which had not a chance to compete with algae and grazers prior to inoculation.



Roger (1995) reported small and variable responses of yield to inoculation and an experimental error frequently larger than the response. He also affirmed that many unsuccessful results of inoculation are not published.

In a survey of published results without inoculation, Roger (1991) shows that the contribution of cyanobacteria to the N balance of rice fields is significant, with average values around 13 kg N·ha<sup>-1</sup>. In temperate rice fields from Uruguay a gross input of 1 kg N·ha<sup>-1</sup> per crop was estimated by the acetylene reduction activity assay (Irisarri et al., 2001). This value of a photo-dependent BNF contribution could be underestimated as cyanobacterial blooms were not considered.

### REASONS FOR THE FAILURE OF INOCULATION

In many cases no benefits in yield were found after inoculation. The low content in cyanobacteria propagules of the inoculum might be one of the reasons for the failure of inoculation. This is not surprising, as the recommended rate of inoculum application will provide on average less than one propagule for every 130 indigenous cyanobacteria already present (Roger and Kulasoriya, 1980). Inoculated strains could not even be detected immediately after inoculation, presumably because they constituted such a small portion of the total population. In other studies, inoculated strains did multiply but rarely dominated the native population of cyanobacteria (Reddy and Roger, 1988).

Many rice fields visually show obvious growth of cyanobacteria but typically only about half of the cyanobacteria genera present are heterocystous and thus nitrogen fixers (Whitton and Roger, 1989).

When beneficial effects on plant growth due to inoculation have been found it is likely that establishment of large populations of cyanobacteria has been possible due to the large phosphorous content of propagules in the inocula, which will give the introduced cells a substantial growth advantage over indigenous strains (Roger et al., 1986). In any case, whether the inoculum strains succeed in becoming established or not, there is little evidence indicating that they can fix N<sub>2</sub> more effectively than indigenous cyanobacteria.

Reddy and Roger (1988) observed a longer persistence of some foreign inoculated strains and the late establishment of blooms of inoculated *Aulosira fertilissima* with predators control, showing some potential for inoculation of rice soils with foreign strains.

The fate of cyanobacteria in the rice field ecosystem depends on their ability to grow, colonize, and survive in the soil (Tomaselli and Giovannetti, 1993). Survival capability did not appear to be closely correlated to the col-

onization process. This process depends mainly on the growth rate and spread of the organisms during favorable conditions. Survival depends on the capability to overcome adverse growth conditions.

Different strains have different capabilities to survive in soils under drought conditions. Survival seems to be related to the existence of resistant structures that are unaffected by desiccation, such as akinetes or sheaths, well represented in *Nostoc* and *Scytonema* (Tomaselli and Giovannetti, 1993). When appropriate conditions for growth are restored, the quiescent cells of the drought-resistant strains fully recover their functions.

Grazing of inoculum by invertebrates was detrimental to inoculum establishment (Grant et al., 1986). Primary consumers that proliferate at the expense of cyanobacteria are a major limiting factor in paddy fields. A large positive N balance was obtained over three rice crops by using neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds to control grazing of cyanobacteria. The dominance of mucilaginous cyanobacteria strains, which happens to be a common observation for rice fields (Begum et al., 1996), should indicate that grazing and drought may be limiting factors for cyanobacterial growth.

Surface broadcast application of nitrogen fertilizer not only inhibits photodependent BNF but also favors the growth of green algae, which increases the pH of the floodwater and causes fertilizer losses by ammonia volatilization (Fillery et al., 1986). Combined sources of nitrogen, which are commonly used in rice production, constitute an important stress on microbial systems. Cyanobacteria could be able to revert to nitrogen-fixing mode, when exogenous nitrogen is depleted. Our results indicated lack of significance of nitrogen treatment at sowing over nitrogen fixation rate measured as acetylene reduction activity (ARA) (Irisarri et al., 2001). High ammonium concentrations can be expected in rice fields when fertilizer is added, but such fertilizer is diluted or consumed in a short time, particularly if it is applied before flooding, as in our conditions.

Delaying N fertilizer application could possibly allow the growth of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterial blooms at the early stages of the crop (Yanni, 1991), but the resulting effects on N losses from fertilizer applied in a cyanobacterial-rich water are unknown. Deep placement of N fertilizer, instead of broadcasting, favored cyanobacterial growth (Roger, 1995).

Acidic soils represent another problem in obtaining better results from inoculation with cyanobacteria (Roger et al., 1980). The majority of cyanobacteria grow through a wide pH range (from 6.5 to 8.5), but some species are sensitive to low pH. Uruguayan rice fields presented an average heterocystous cyanobacterial density lower than tropical ones (Irisarri et al., 2001). The slightly acidic pH of the soil could explain the abundant green algae and aquatic weed development which competed for light with cyanobacteria.



Solar ultraviolet-B (UVB) radiation at the earth's surface is increasing due to a continued depletion of the stratospheric ozone layer, and the survival of some cyanobacteria is severely affected by UV light (Sinha and Häder, 2000).  $N_2$ -fixing cyanobacteria strains having photoprotective compounds may be potent candidates as biofertilizers.

Pesticides may have adverse effects on the growth of cyanobacteria. Sensitivity of cyanobacteria to herbicides varies according to the species (Leganés and Fernández-Valiente, 1992). The addition of field-recommended doses of quinclorac and propanil, two herbicides commonly used in Uruguay as cyanobacterial isolates, affected oxygen photoevolution but not nitrogenase activity (Irisarri et al., 2001). On the contrary, some pesticides have been found to accelerate the growth of cyanobacteria (Wright et al., 1977).

More attention should be given to the impact of physical, chemical, and biological limiting factors occurring in the field, to improve the biofertilizer benefit:cost ratio (Mulongoy et al., 1991).

### **BENEFITS OF CYANOBACTERIA BEYOND NITROGEN INPUT TO THE AGROECOSYSTEM**

Biofertilizers can affect growth and yield of plants either directly or indirectly through different mechanisms. For example, a buildup of organic matter takes place due to cyanobacteria inoculation (Das et al., 1991). The amount of addition of organic C to soils by the growth of cyanobacteria varies from  $0.45 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  to  $41.6 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  (Rao and Burns, 1990), contributing to humus formation despite the absence of typical lignin in them. A good cyanobacterial bloom and persistence as soil organic matter depends on decomposability, which in turn depends on the biodegradability of cell wall compounds and their physiological growth stages. Data of long-term experiments are lacking (Mandal et al., 1999), but inoculation may bring about, directly or indirectly, certain changes in the physical, chemical, and biological properties of the soil and soil-water interface in rice fields, which are of agronomic importance. The extracellular organic compounds liberated by the cyanobacteria; the  $O_2$  released due to photosynthesis during their active growth period; and the subsequent addition of biomass after their death are likely to cause some important changes in the physicochemical properties of the soil, including retardation of  $NH_3$  volatilization, mobilization of fixed phosphates, and regulation of micronutrients (particularly Fe, Mn, and Zn), affecting their availability. Cyanobacteria are known to have the ability to mobilize bound phosphates in soil sediments or in pure culture (Roger, 1995), possibly because of organic acid excretion. There is increas-

ing evidence that crops grown in organic-rich and biologically active soils are less susceptible to pest attack (Altieri, 2002).

However, these benefits can be achieved only if there is a good growth of cyanobacteria in rice fields.

### **IS INOCULATION WITH CYANOBACTERIA WORTHWHILE?**

It is important to verify that N is actually limiting before improving BNF. Significant yield responses to applied N are obtained on nearly all lowland rice soils when irrigation is adequate and weeds or pest problems do not limit growth (Cassman et al., 1998). Because knowledge of factors that allow cyanobacteria to establish and bloom in rice fields is limited, inoculation is conducted on a trial-and-error basis. No method for estimating the chance of success of inoculation in a given agroecosystem is available.

The ubiquity of heterocystous cyanobacteria in rice soils does not imply that inoculation is not needed. The extent to which inoculation will eventually prove worthwhile will depend on local circumstances. The response is likely to be most evident in nonacidic soils with moderate to high phosphorous availability where nitrogen fertilizer is not broadcast. Since spore germination is photodependent, inoculated propagules applied on the soil surface might germinate better than indigenous propagules mixed with the soil (Roger, 1991). Agrosystems with a long dry fallow or an upland crop before rice may be especially responsive to inoculation (Roger, 1991). A low incidence of grazers and a lower indigenous density of viable propagules of cyanobacteria after the dry period would explain these systems' inoculation dependence.

During unfavorable seasons most heterocystous cyanobacteria can form perennating bodies which germinate with the onset of favorable conditions. Under such circumstances, inoculation should reduce the lag time necessary to reach an appropriate cyanobacteria population density (Roger, 1991).

Data appear to be lacking to support the claim by Agarwal (1979) that the introduced cyanobacteria can establish themselves if inoculation is done repeatedly for three to four cropping seasons.

In general, cyanobacteria have less potential in terms of nitrogen fixation than legumes or *Azolla*, but inoculation, when successful, is a low-cost technology with a cost:benefit ratio far more favorable than that of green manure (Roger, 1991). This may ensure a much better survival rate of the microorganisms and easy transportation and application of the biofertilizer.

Roger (1995) proposed to enhance the growth of indigenous cyanobacteria in rice fields as an alternative strategy to inoculation for improving



the inputs of  $N_2$  fixation. According to Balandreau and Roger (1996), the goal of developing BNF is not to achieve the maximum nitrogen input; it is to achieve the maximum income (money and/or food) for farmers. Increasing BNF is desirable not only because the cost of synthetic fertilizer is unpredictable but also because it contributes to the sustainability of soil fertility. An indispensable requirement of sustainable agriculture is the continuous renewal of soil structure and fertility with renewable resources, lessening the need for chemical fertilizers, thus reducing their environmental burden.

Inoculation is advisable with local strains to deal with bacteria adapted to the plant and to the local edaphic and climatic conditions. Introduced cyanobacteria are difficult to produce in large quantities and are rarely well established.

Defining environmental conditions in which natural or inoculated cyanobacteria can add onto current mineral N fertilizer applications is the strategy for the future.

### **INTEGRATED SOIL FERTILITY MANAGEMENT**

In the 1960s and 1970s, the green revolution increased agricultural output with the assistance of chemical fertilizers and pesticides, high yielding seed varieties, and intensive land use. Although contributing to production, these new technologies also had potential risks: unbalanced, excessive, or untimely application of agrochemicals could deplete soil, cause water pollution, render commonly used pesticides ineffective, and harm human health and environment. The environmental impact and sustainability of development have become an international priority issue. More prudent agricultural cultivation practices, for example, integrated soil fertility management and green and organic agriculture have generated worldwide attention.

To improve agricultural production, we must not disregard the development of a more self-sufficient and sustaining agriculture with a deeper understanding of the nature of agroecosystems and the principles by which they function (Altieri, 2002).

A good example of this approach is the results obtained by Yanni and Osman (1990). Natural infection with leaf and neck blast caused by *Pyricularia oryzae* in rice became elevated with increasing N fertilization. Inoculation with fresh cyanobacteria decreased leaf blast. Yanni and Sehly (1991) suggested that inoculation gave rise to a slow release of biologically fixed  $N_2$ . Such a mechanism could regulate the N status of the rice ecosys-

tem without exceeding the critical level at which susceptibility to blast may dramatically increase.

On the other hand, demand is growing for organically grown food products. In this situation the ecological and economic merits of biofertilizers have been highlighted and the production of organic rice should depend on BNF.

### FUTURE PERSPECTIVES

The efficiency of nitrogen inputs must be significantly improved for two reasons: first, the manufacture of inorganic fertilizer N requires fossil fuels, which are a nonrenewable resource; second, inefficient use of both inorganic fertilizer N and organic nitrogen leads to gaseous emission of N to the atmosphere which may contribute to global change.

The challenges for the future are to employ more suitable cyanobacteria to produce biofertilizers and to better understand rice agroecosystems so as to make the use of cyanobacteria profitable.

Efforts have been made to obtain cyanobacteria strains with especially high nitrogen-fixing ability to be incorporated into the inocula, but there is no evidence that such mutant strains have a particular advantage in the field.

Another approach to achieve this can be through the development of ammonia-leaking strains. *Anabaena azollae* actually makes available the nitrogen fixed by it to *Azolla* as ammonia. *Anabaena azollae* and *A. variabilis*, when immobilized in polyurethane and polyvinyl foams or calcium alginate beads, have been shown to release ammonia extracellularly (Kannaiyan et al., 1994). Algal mutants with defects in the regulation of the enzyme glutamine synthetase can be made to liberate ammonia. As genetically improved cyanobacteria face competition with the predominant native species, it may be advisable to use somaclones of *Anabaena-Azollae* (Sinha et al., 1998).

It may prove useful to introduce fast-growing strains, although Roger (1996) stated that most fast-growing strains with doubling times of 5 to 12 h belong to *Anabaena* genus and do not form mucilaginous colonies, so they would certainly be susceptible to grazing.

Whitton and Roger (1989) pointed out that introduced strains with high nitrogen-fixing ability did not survive unless there was a simultaneous change in the environment, which gave them a competitive advantage.

Modern agricultural fields are generally treated with high doses of N fertilizers and pesticides despite the adverse effects these may exert on the soil microflora of naturally occurring N-fixing cyanobacteria. Vaishampayan et al. (1998) indicated the need to develop ammonia-derepressible pesticide-



resistant cyanobacterial mutants as a viable and efficient photobiological N fertilizer phycotechnology. Although some of these strains perform well under in situ conditions, they need further improvement to adapt to the various biotic and abiotic stress factors operative in the fields, particularly with respect to strain competition during changes in edaphic and climatic conditions. A knowledge of the various biotic and abiotic stress factors that may be operative in the field is a prerequisite for mass cultivation of mutant cyanobacteria for field experiments. Some factors may modify cyanobacterial physiology in the field while others may either cause leaching, photodecomposition, volatilization, or possible microbial degradation of the pesticides or conversion of the same to more powerful multiple inhibitors in the field (Vaishampayan et al., 1998). The genetically manipulated cyanobacterial species may act more efficiently as the self-renewable constitutive N supply in wet agriculture, producing ammonia at the sole expense of the plentiful solar energy, atmospheric CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, and water, irrespective of the pre- or posttreatment of the fields with pesticides and/or synthetic N fertilizers. These may not completely replace the use of the latter but may contribute in considerably reducing their use; these may help in making up the significant loss of the available fixed N from the soil.

The survival of the transgenic microbial inoculant population, its monitoring, and positive and negative interactions with indigenous microbial populations are the challenges that face this emerging technology (Tengerdy and Szakács, 1998).

### CONCLUSIONS

In Asia, 24 percent of the increase in rice production from 1965 to 1980 was attributed to better crop nutrition due primarily to the increased use of N fertilizers. Today, more than 20 percent of all N fertilizers produced worldwide are applied to the rice fields of Asia. The densely populated and land-scarce nations of Asia, where more than half of the earth's people live and rice is a staple food, are dependent on petroleum-based fertilizers. Any reduction in the consumption of this fertilizer without affecting productivity as well as the introduction of a cyclic nutrient supply system through biological sources would be ecologically and economically advantageous.

In temperate rice cultivation, biofertilizers appeared also as ecologically friendly and economically important alternatives for organic rice production.

The challenge is to increase our knowledge about limiting factors for cyanobacteria contribution to the N status of rice ecosystem. It is of no use

to transfer technologies from one site to another, if the set of ecological interactions associated with such techniques cannot be replicated.

In the context of biological management of soil fertility, we must consider that the advantages of slow N release might not be apparent in the first crop after inoculation and that the feasibility of the technique is not assured.

There is still a lot to investigate about the multiple effects of natural resources management, some of which may even be undesirable. Perhaps biofertilizers may not be an alternative to synthetic fertilizers, but they can enhance the availability of plant nutrients from the soil.

#### REFERENCES

- Agarwal A. (1979). Blue-green algae to fertilize Indian rice paddies. *Nature* 279: 181.
- Alfassi F.A., Algarni S.M., and Kabli S.M. (1997). Efficiency of cyanobacteria from soil of western region in the kingdom of Saudi-Arabia as biofertilizer for wheat. *Arab Gulf Journal of Scientific Research* 15: 481-503.
- Altieri M.A. (2002). Agroecology: The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 1-24.
- Balandreau J. and Roger P. (1996). Some comments about a better use of biological nitrogen fixation in rice cultivation. In M. Rahnan, A. Kumar, C. van Hove, Z.N.T. Begum, T. Heulin, and Hartmann A. (eds.), *Biological nitrogen fixation associated with rice production* (pp. 1-12). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Begum Z.N.T., Mandal R., Khan U.M.Z., and Hossain M.Z. (1996). Prospects and potentiality of cyanobacteria as an alternative source of nitrogen fertilizer in Bangladesh rice cultivation. In M. Rahnan, A. Kumar, C. van Hove, Z.N.T. Begum, T. Heulin, and Hartmann A. (eds.), *Biological nitrogen fixation associated with rice production* (pp. 119-131). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Cassman K.G., Peng S., Olk D.C., Ladha J.K., Reichardt W., Dobermann A., and Singh U. (1998). Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crop Research* 56: 7-39.
- Das S.C., Mandal B., and Mandal L.N. (1991). Effect of growth and subsequent decomposition of blue-green algae on the transformation of iron and manganese in submerged soils. *Plant and Soil* 138: 75-84.
- De P.K. (1939). The role of blue green algae in nitrogen fixation in rice fields. *Proceedings of Research Society of London* 127: 121-139.
- Fernández-Valiente E., Quesada A., Prospero C., Trillo M., Carreres R., and González T. (1996). Contribution of biological nitrogen fixation to rice production in Mediterranean rice fields. In M. Rahnan, A. Kumar, C. van Hove, Z.N.T. Begum, T. Heulin, and A. Hartmann (eds.), *Biological nitrogen fixation associated*



- with rice production (pp. 147-157). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Fillery I.R.P., Roger P.A., and De Datta S.K. (1986). Ammonia volatilization from nitrogen sources applied to rice fields: II. Floodwater properties and submerged photosynthetic biomass. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 86-91.
- Ghosh T.K. and Saha K.C. (1997). Effects of inoculation of cyanobacteria on nitrogen status and nutrition of rice (*Oryza sativa* L.) in an Entisol amended with chemical and organic sources of nitrogen. *Biol Fertil Soils* 24: 123-128.
- Grant I.F., Roger P.A., and Watanabe I. (1986). Ecosystem manipulation for increasing biological N<sub>2</sub> fixation by blue-green algae (cyanobacteria) in lowland rice fields. *Biological Agriculture and Horticulture* 3: 299-315.
- Hashem M.A., Islam M.R., Jahiruddin M., and Asaduzzaman M. (1996). Enrichment of indigenous blue-green algal population in rice fields and evaluation of its effect in rice culture. In M. Rahnan, A. Kumar, C. van Hove, Z.N.T. Begum, T. Heulin, and A. Hartmann (eds.), *Biological nitrogen fixation associated with rice production* (pp. 159-167). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Hori K., Ishii S., Ikeda G., Okamoto J., Tanji Y., Weeraphasphong C., and Unno H. (2002). Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena* spp. in water column and its cellular characteristics. *Biochemical Engineering Journal* 10: 217-225.
- Irisarri P., Gonnet S., Deambrosi E., and Monza J. (1999). Diversity of heterocystous cyanobacteria in rice soils. *Agrociencia* 3: 31-37.
- Irisarri P., Gonnet S., and Monza J. (2001). Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: Diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *Journal of Biotechnology* 91: 95-103.
- Kannaiyan S., Aruna S.J., Kumari S.M.P., and Hall D.O. (1994). Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. *Journal of Applied Phycology* 9: 167-174.
- Leganés F. and Fernández-Valiente E. (1992). Effects of phenoxy-acetic herbicides on growth, photosynthesis and nitrogenase activity in the cyanobacteria from rice fields. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 130-134.
- Mandal B., Vlek P.L.G., and Mandal L.N. (1999). Beneficial effects of blue-green algae and *Azolla*, excluding supplying nitrogen, on wetland rice fields: A review. *Biol. Fertil. Soils* 28: 329-342.
- Mulongo K., Gianinazzi S., Roger P.A., and Dommergues Y. (1991). Biofertilizers: Agronomical and environmental impacts and economics. In E.J. DaSilva, C. Ratledge, and A. Sasson (eds.), *Microbial technology: Economical and social aspects* (pp. 1-13). Cambridge: Cambridge University Press.
- Rao D.L.N. and Burns R.G. (1990). The effect of surface growth of blue-green algae and bryophytes on some microbiological, biochemical and physical soil properties. *Biol. Fertil. Soils* 9: 239-244.
- Reddy P.M. and Roger P.A. (1988). Dynamics of algal populations and acetylene-reducing activity in five rice soils inoculated with blue-green algae. *Biol. Fert. Soils* 6: 14-21.

- Reynaud P.A. and Metting B. (1988). Colonization potential of cyanobacteria on temperate irrigated soils in Washington State, USA. *Biological Agriculture and Horticulture* 5: 197-208.
- Reynaud P.A. and Roger P.A. (1978). N<sub>2</sub>-fixing algal biomass in Senegal rice fields. *Ecological Bulletin* 26: 148-157.
- Roger P.A. (1991). Reconsidering the utilization of blue-green algae in wetland rice cultivation. In S.K. Dutta and C. Sloger (eds.), *Biological N<sub>2</sub> fixation associated with rice production* (pp. 119-141). New Dehli, India: Oxford & IBH Pub.
- Roger, P.A. (1995). Biological N<sub>2</sub>-fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertilizer Research* 42: 261-276.
- Roger P.A. (1996). Fauna. In W.H. Smith (ed.), *Biology and management of the floodwater ecosystem in rice fields* (pp. 57-78). IRRI, ORSTOM.
- Roger P.A. and Kulasooriya S. (1980). *Blue green algae and rice*. Manila, Philippines: IRRI.
- Roger P.A., Kulasooriya S., Tirol A.C., and Craswell E.T. (1980). Deep placement: A method of nitrogen fertilizer application compatible with algal nitrogen fixation in wetland rice soils. *Plant and Soil* 57: 137-142.
- Roger P.A., Santiago-Ardales S., Reddy P.M., and Watanabe I. (1987). The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol. Fertil. Soils* 5: 98-105.
- Roger P.A., Santiago-Ardales S., and Watanabe I. (1986). Chemical composition of cultures and natural samples of N<sub>2</sub>-fixing blue-green algae from rice fields. *Biol. Fertil. Soils* 2: 131-146.
- Roger P.A., Zimmerman W.J., and Lumpkin T. (1993). Microbiological management of wetland rice fields. In B. Metting (ed.), *Soil microbial technologies* (pp. 417-455). New York: Marcel Dekker.
- Saha K.C. and Mandal L.N. (1980). Agrochemical studies on the effect of inoculation of N-fixing blue-green algae on an alluvial soil treated with P and Mo on the yield of rice and changes in the N content of the soil. *Plant and Soil* 57: 23-30.
- Sinha R.P. and Häder D.-P. (2000). Effects of UV-B radiation on cyanobacteria. *Recent Res. Devel. Photochem. Photobiol.* 4: 239-246.
- Sinha R.P., Vaishampayan A., and Häder D.-P. (1998). Plant cyanobacterial symbiotic somaclones as a potential bio-nitrogen fertilizer for paddy agriculture biotechnological approaches. *Microbiol. Res.* 153: 297-307.
- Tengerdy R.P. and Szakács G. (1998). Perspectives in agrobiotechnology. *Journal of Biotechnology* 66: 91-99.
- Thind H.S. and Rowell D. (1999). The fate of algal nitrogen in a flooded soil system. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 55: 89-94.
- Tirol A.C., Roger P.A., and Watanabe I. (1982). Fate of nitrogen from blue-green algae in a flooded rice soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 28: 559-569.
- Tomaselli L. and Giovannetti L. (1993). Survival of diazotrophic cyanobacteria in soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 113-116.
- Vaishampayan A., Sinha R.P., and Häder D.-P. (1998). Use of genetically improved nitrogen-fixing cyanobacteria in rice paddy fields: Prospects as a source material for engineering herbicide sensitive and resistance in plants. *Bot. Acta* 111: 176-190.



- Venkatamaran G.S. (1981). Blue-green algae: A possible remedy to nitrogen scarcity. *Curr Sci* 50: 253-256.
- Watanabe I. (1986). Nitrogen fixation by non-legumes in tropical agriculture with special reference to wetland rice. *Plant and Soil* 90: 343-357.
- Watanabe I., Nishigaki S., and Konishi C. (1951). Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. *Nature* 168: 748-749.
- Whitton B.A. and Roger P.A. (1989). Use of blue-green algae and *Azolla* in rice culture. In R. Campbell and R.M. Macdonald (eds.), *Microbial inoculation of crop plants*, Volume 25 (pp. 89-100). Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- Wright S.J.L., Stainhorpe A.F., and Downs J.D. (1977). Interactions of the herbicide propanil and a metabolite, 3,4 dichloroaniline, with blue-green algae. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 12: 51-60.
- Yanni Y.G. (1991). Potential of indigenous cyanobacteria to contribute to rice performance under different schedules of nitrogen application. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 48-52.
- Yanni Y.G. (1996). Contribution of cyanobacterization to rice growth and performance under different field stand densities and levels of combined nitrogen. In M. Rahnan, A. Kumar, C. van Hove, Z.N.T. Begum, T. Heulin, and A. Hartmann (eds.), *Biological nitrogen fixation associated with rice production* (pp. 113-139). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers..
- Yanni Y.G. and Osman Z.H. (1990). Contributions of algalization to rice growth, yield, N attributes and incidence of infestation with the blast fungus *Pyricularia oryzae* under different fungicidal treatments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 371-376.
- Yanni Y.G. and Sehly M.R. (1991). Rice performance and natural infection with blast (*Pyricularia oryzae* Cav.) under different algalization techniques and rates of fertilizer nitrogen. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 43-47.
- Zaccaro M.C. (2000). Plant growth-promoting cyanobacteria. In *Proceedings of the 5th International PGPR Workshop, Córdoba, Argentina*. Available online at <<http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/zaccaro.pdf>>.

# Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice

Pilar Irisarri · Susana Gonnet · Enrique Deambrosi · Jorge Monza

Received: 7 April 2006 / Accepted: 10 June 2006  
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

**Abstract** During three rice-growing seasons in Uruguay, field experiments were conducted to study the contribution of cyanobacterial inoculation and chemical N fertilization to rice production. Neither grain yield nor fertilizer recovery by the plant were affected by inoculation with native cyanobacterial isolates. A low fertilizer use efficiency (around 20%) was observed when labelled  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was applied at sowing. Recovery of applied  $^{15}\text{N}$  by the soil-plant system was 50%. Inoculation did not modify  $^{15}\text{N}$  uptake by the plant when the fertilizer was three-split applied either. The total N-fertilizer recovery was higher when the fertilizer was split than when applied in a single dose. Plant N-fertilizer uptake was higher when the fertilizer was applied at tillering. Uptake of  $^{15}\text{N}$  from cyanobacteria by rice was studied in a greenhouse pots experiment without chemical nitrogen addition. Recovery of  $^{15}\text{N}$  from labelled cyanobacteria by rice in greenhouse growth conditions was similar to that of partial recovery of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  applied at sowing in the field. Cyanobacterial N mineralization under controlled conditions was fast as cyanobacterial N was detected in plants after 25 days. Moreover 40 days after inoculation non-planted and inoculated soil had more inorganic N than the non-inoculated one.

**Keywords** Fertilizer N utilization · heterocystous cyanobacteria · mineralization ·  $^{15}\text{N}$  · ricefield

## Introduction

Rice is mainly grown under irrigated conditions where nitrogen fertilizer efficiency is low due to large N losses from flooded soils (De Datta and Buresh 1989). Soil N pool in ricefields is principally maintained by fertilizer N and biological nitrogen fixation (Kundu and Ladha 1995). Among nitrogen-fixers in rice fields, cyanobacteria are important contributors to  $\text{N}_2$  fixation (Roger and Ladha 1992). Cyanobacterial trophic independence makes them suitable for being used as biofertilizers (Irisarri 2006). Most published data of inoculation with cyanobacteria refer to tropical ricefields, which are different in characteristics and agricultural management from temperate ones. Biological N fixation is far more diverse and complex in the tropics than under temperate conditions (Balandreau and Roger 1996). Assays of cyanobacterial inoculation in temperate climates were performed in the USA (Reynaud and Metting 1988), Spain (Fernández-Valiente et al. 1996), Italy and Argentina (Zaccaro 2000).

The average heterocystous cyanobacterial density in Uruguayan temperate ricefields is lower than those reported for other ricefields (Irisarri et al. 2001). Therefore inoculation with native cyanobacterial isolates appeared as a possible supplementary nitrogen input to this ecosystem. Inoculation may decrease the necessary time for cyanobacteria to divide and efficiently colonize the soil (Balandreau and Roger 1996). Nitrogen fixed by cyanobacteria may become available to rice plants only after its release into their

P. Irisarri (✉) · S. Gonnet · J. Monza  
Laboratorio de Bioquímica, Dpto. Biología Vegetal,  
Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, 12900  
Montevideo, Uruguay  
e-mail: irisarri@fagro.edu.uy

E. Deambrosi  
INIA Treinta y Tres, Treinta y Tres, Uruguay



surroundings, by mineralization of their intracellular content and/or as extracellular products (Sinha and Häder 1996). So, it was supposed that a successful set-up of desired cyanobacteria in the ricefields would be a source of slow release of nitrogen according to plant demands. Quantitative information regarding transfer of cyanobacterial nitrogen to rice is scarce (Ghosh and Saha 1997).

Nitrogen taken up by the crop growing on a soil that has been fertilized with N comes partly from the fertilizer and partly from soil, mineralized from organic matter. When the fertilizer is added in a labelled form ( $^{15}\text{N}$ ) the amount of N in the crop originating from the soil, which includes that from cyanobacteria and from the fertilizer, can be determined.

An assay with labelled N-fertilizer and cyanobacterial inoculation was proposed to quantify the N provided to the rice plant by the fertilizer and one with labelled cyanobacteria to estimate the time required for their mineralization.

The aim of this study was to quantify how much nitrogen from fertilizer was incorporated into rice and to establish if cyanobacterial inoculation contributed to nitrogen nutrition and rice yield during the crop cycle.

## Materials and methods

### Field experiments

Field assays were conducted during three consecutive crop seasons at Estación Experimental Paso de la Laguna—INIA Treinta y Tres at the east of Uruguay. The soil was, according to FAO taxonomy, Albic Natraqualf. Main properties of the soil for the three growth seasons are described in Table 1. The mean 5-month daily precipitation for the 3-year growing period of rice culture (2000–2003) was 7.3 mm and the mean temperature was 21°C. Rice was sown in dry soil and flooding was established four weeks after.

Experiments were established in a completely random design with three replicates. Basal P fertilization and herbicide application were similar for all treatments.

**Table 1** Soil properties for the three rice growing periods (October–March for the South Hemisphere)

Year	pH (H <sub>2</sub> O)	OM%	P Bray ppm	K meq/100 g
2000–2001	5.4	2.71–3.26	6.4–7.1	0.22–0.23
2001–2002	5.4–5.5	2.41–2.81	5.6–6.5	0.22–0.23
2002–2003	5.1–5.2	2.64–3.21	7.3–9.1	0.27–0.29

For the first two crop seasons, when the labelled fertilizer was applied at sowing, the rice variety was El Paso 144 and for the last crop season, when the fertilizer was split applied, rice variety was INIA Tacuarí.

During 2000–2001 and 2001–2002, plots were fertilized with  $^{15}\text{N}$ -labelled ammonium sulfate (ISOTEC Inc.) in solution at a rate of 10 Kg N ha<sup>-1</sup> (30 at.% excess  $^{15}\text{N}$ ) and inoculated with cyanobacteria 40 days after, at tillering. Non-inoculated  $^{15}\text{N}$ -fertilized plots were used as controls. Experimental plots of 6 m<sup>2</sup> were used for yield evaluation and 1 m<sup>2</sup> microplots for  $^{15}\text{N}$  assays.

The inoculant was prepared culturing three Uruguayan heterocystous ricefield cyanobacterial isolates in BGII medium, *Nostoc* BI42, *Anabaena* BI46 and *Calothrix* BI 22, and the mixture final concentration applied at flooding was  $2 \times 10^6$  c.f.u. m<sup>-2</sup>.

Soil (upper 15 cm) and aboveground plant samples were collected at harvest, the grain and straw of rice plants were separated and were analysed for total nitrogen by Kjeldahl digestion and  $^{15}\text{N}$  with a mass spectrometer (IRMS Micromass Isochrom) at SIDI-Laboratorio de Isótopos Estables, UAM, Spain. Fertilizer use efficiency (FUE) was calculated according to IAEA (2001).

In the crop season 2002–2003 total N rate (30 kg N/ha) was split at three different moments, rice emergence, tillering and panicle initiation. In the factorial experiment (3 fertilization dates  $\times$  2 inoculation) only the time of the labelled fertilizer application (10 kg N ha<sup>-1</sup> as 5 atom % excess  $^{15}\text{N}$ -ammonium sulfate) changed, thus the effect of timing was measured in the absence of any plant-fertilizer interaction. Plants samples were collected at tillering, panicle initiation and harvest when the labelled fertilizer was applied at emergence, tillering and panicle initiation, respectively. Partial fertilizer use efficiency was calculated for each application time and total FUE as the sum of the three partial FUE.

Data were analysed with SAS software. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine the significance of main effects and their interactions.

### Mineralization assay

An experiment with rice sown in plastic boxes and inoculated with  $^{15}\text{N}$ -labelled cyanobacteria was conducted in greenhouse. Isolates of *Nostoc* BI42, *Anabaena* BI46 and *Calothrix* BI 22 were grown in BGII with  $^{15}\text{N}$ -ammonium sulfate as nitrogen source and the suspension was centrifuged and washed with H<sub>2</sub>O in order to eliminate  $^{15}\text{N}$  excess. The inoculant was added

simultaneously with flooding at a concentration of  $0.9 \text{ Kg N ha}^{-1}$  ( $9 \times 10^7 \text{ c.f.u. m}^{-2}$ ) and 38 at.% excess  $^{15}\text{N}$ . Plant samples were collected at 25, 55 and 100 days after inoculation and were analysed for total nitrogen and  $^{15}\text{N}$  content.

## Results and discussion

### Fertilizer nitrogen recovery

Nitrogen incorporated to rice comes both from fertilizer and soil organic matter mineralization. The use of a  $^{15}\text{N}$ -labelled fertilizer allows discrimination of how much nitrogen derives from fertilizer.

The percentage of  $^{15}\text{N}$  recovery by plants without inoculation (Table 2) ranged from 14% to 22% depending on the year. N-fertilizer recovery by plants was low but similar to that reported for other ricefields (De Datta et al. 1987; Sheehy et al. 2004; Fernandez-Valiente et al. 2000).

The total  $^{15}\text{N}$  recovered from the soil–plant system for the crop season 2000–2001 was 43% (Table 2). Applied N loss in rice paddy soils is mainly attributed to coupled nitrification–denitrification and  $\text{NH}_3$  volatilization. Volatilization has been reported as the main source of N loss in rice fields (Cassman et al. 1998) but in Uruguayan culture conditions, nitrification may be considerable before flooding (Tarlera et al. 2006).

When the fertilizer was applied at a dose of  $10 \text{ Kg N ha}^{-1}$ , at least 98% of the plant N-uptake came from the soil. In spite of this, the soil N content (0.16%) did not decrease after harvest, meaning that biological nitrogen fixation contributed to the nitrogen budget of this ecosystem.

Splitting the N rate has been suggested as the best choice to optimize fertilizer efficiency (Stevens et al. 2001) so a three-way split timing of N fertilizer was assayed. The partial fertilizer use efficiency of the  $10 \text{ Kg}$  of labelled  $\text{N ha}^{-1}$  for the three application dates varied from 7% at panicle initiation to 21% at tillering (Table 3). Significant differences were found in plant N derived from fertilizer among the three application dates ( $p < 0.01$ ). In agreement with other reports (Norman et al. 1992; Wilson et al. 1989) the highest N-fertilizer recovery was found at tillering (Fig. 1). The plant N derived from fertilizer was low (0.24%) when the fertilizer was added at panicle initiation. The plant N-content evolution along the crop cycle when the fertilizer was split applied, shows that most of the nitrogen uptake occurred previous to panicle initiation (Fig. 2).

The total N-fertilizer recovery in plants was higher when the fertilizer was split, 40%, (Table 3) than when applied in a single dose, 14% and 22% (Table 2). More effective crop utilization of nitrogen and reduced  $^{15}\text{N}$ -losses with the three split, may explain the increase in N recovered by the aboveground biomass (grain and straw).

**Table 2** Productivity, plant nitrogen, fertilizer use efficiency and N recovery by plants and soil

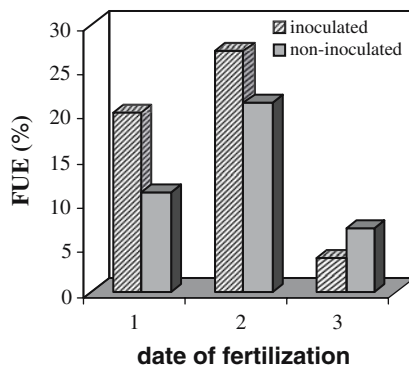
Crop	Treatment	Grain Yield (Kg ha <sup>-1</sup> )	Plant N* (Kg ha <sup>-1</sup> )	Plant Ndff (Kg ha <sup>-1</sup> )	% Ndff	FUE%	Soil Ndff (Kg ha <sup>-1</sup> )	% <sup>15</sup> N Soil + Plant recovery
2000–2001	Inoculated	7276 ± 921	127.5	2.2	1.7	21.8	4.2	64.1
	Non-inoculated	7858 ± 219	135.8	2.1	1.6	21.5	2.2	43.4
2001–2002	Inoculated	6401 ± 381	135.3	1.7	1.2	17.2	nd	nd
	Non-inoculated	6250 ± 226	127.0	1.4	1.0	14.0	nd	nd

Ndff, N derived from fertilizer; nd, not determined; Values of grain yield, plant N, Ndff and FUE for each crop were not significantly different at  $p < 0.05$ ; Soil Ndff values (2000–2001) were only significantly different at  $p < 0.08$ ; \*grain + straw

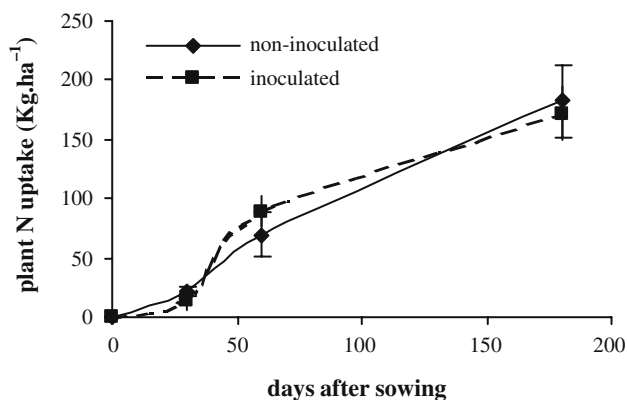
**Table 3** Effect of inoculation and fertilizer timing on partial plant N recovery

Treatment	( <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Application	Plant N(Kg ha <sup>-1</sup> )	Straw Ndff (Kg ha <sup>-1</sup> )	Grain Ndff (Kg ha <sup>-1</sup> )	Plant % Ndff	Partial FUE%
Inoculated	Emergence	195.7	0.73	1.29	1.00 <sup>b</sup>	20.1
	Tillering	183.3	1.21	1.50	1.51 <sup>a</sup>	27.1
	Panicle initiation	156.2	0.14	0.24	0.24 <sup>c</sup>	3.8
Non-inoculated	Emergence	162.9	0.40	0.70	0.65 <sup>b</sup>	11.1
	Tillering	184.3	0.85	1.28	1.15 <sup>a</sup>	21.3
	Panicle initiation	200.5	0.15	0.57	0.37 <sup>c</sup>	7.2

Interaction between inoculation and date of N fertilizer application was non-significant; Means in the same column followed by different letters were significantly different at  $p < 0.01$



**Fig. 1** Partial fertilizer use efficiency when the labelled fertilizer was applied at: (1) rice emergence, (2) tillering and (3) panicle initiation



**Fig. 2** Plant nitrogen uptake since sowing to harvest for the inoculated and non-inoculated treatments. The data are mean of three replicates and the bars correspond to the standard deviations

#### Effect of inoculation on yield response and nitrogen uptake

Inoculation of cyanobacteria did not cause a positive grain yield response compared with the non-inoculated controls (Table 2) like in many other cases (Roger et al. 1993; Watanabe 1986). However, yield increase after inoculation was reported by Balandreau and Roger (1996) and by Ghosh and Saha (1997).

No effects on yield could be explained by several causes. The number of heterocystous cyanobacteria in soil was not higher in the inoculated plots than in the non-inoculated ones immediately after inoculation although it increased at the end of the crop cycle (data not shown). The initially slightly acidic pH of the soil could affect cyanobacterial growth besides favour eucaryotic algal development. Likewise light could be considered a limitant to cyanobacterial N<sub>2</sub> fixation mainly at the end of the cycle.

Reddy and Roger (1988) showed that inoculated strains did multiply but rarely dominated the native

population of cyanobacteria. The fate of cyanobacteria in the ricefield ecosystem depends on their ability to grow, colonize and survive in the soil (Tomaselli and Giovannetti 1993). Because knowledge of the factors that allow cyanobacteria to establish and bloom in ricefields is limited, inoculation is conducted on a trial-and-error basis. The inoculant in this work was produced in the laboratory growing the three most abundant field isolates without a chance to compete with algae and grazers present in the ricefield, which would affect inoculant survival.

Plant nitrogen derived from fertilizer was not different between the inoculated plots and the non-inoculated ones (Table 2). This does not necessarily mean that there was no biological nitrogen fixation but that inoculation could not increase the nitrogen currently fixed and mineralized in this flooded soil.

For the crop season 2000–2001, the N derived from fertilizer in soil at harvest was different with  $p < 0.08$  between treatments. More N-fertilizer was recovered by the soil than by the plant in the inoculated plots (Table 2). Since there was no difference in the plant nitrogen derived from fertilizer for both treatments (Table 2), the explanation of this result may be an increase in microbial N-immobilization due to inoculation. The photosynthetic biomass has been reported as decreasing N losses by transitory immobilization as organic N in soil (Roger 1996).

Since no effect of inoculation could be detected when all the fertilizer was applied in a single dose, a three-way split timing of N fertilizer was assayed. Inoculation did not increase yield when the fertilizer was split (data not shown). Partial plant Ndff for each fertilization time was not different for the inoculated treatment also (Table 3).

Although the cyanobacterial isolates used for the inoculant were good fixers under laboratory conditions, the failure of inoculation may be explained by the amount of inoculant applied and by field conditions that limit N<sub>2</sub> fixation.

#### Cyanobacterial nitrogen mineralization

The biofertilizer N efficiency measured at different growth stages of rice ranged from 5%, 25 days after inoculation, to 12% at harvest (Table 4). Nitrogen from cyanobacteria could be detected in plants as early as 25 days after inoculation.

At harvest the fertilizer use efficiency of cyanobacterial N was similar to the partial one of chemical fertilizer applied at emergence in the field experiment (Tables 3 and 4). The applied biomass of cyanobacteria

**Table 4** Cyanobacterial N recovery efficiency

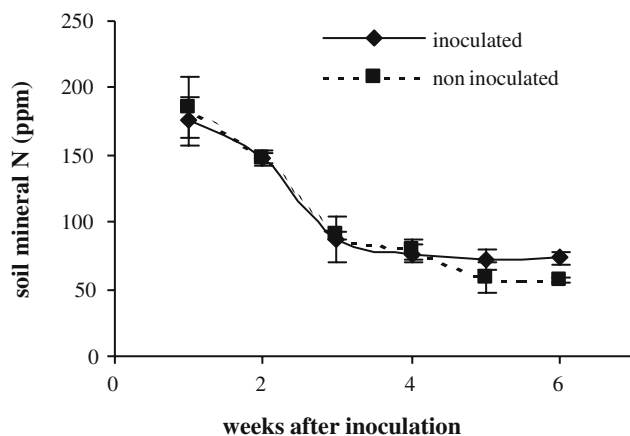
Days after inoculation	Growth stage of rice	g Ndff (Cyanobacteria) <sup>a</sup>	FUE %
25	Floral Primordia	45 ± 9	5.0
55	Flowering	60 ± 16	6,7
100	Harvest	105 ± 22	11,7

<sup>a</sup> Values are means of four replicates ± standard error

started decomposition within a few days of inoculant application. This is evidenced by the assimilation of <sup>15</sup>N by the rice plant within 25 days (Table 4) and by <sup>15</sup>N inorganic accumulation in soils (Fig. 3). The cyanobacterial mineralization rate was not therefore the limitative to N plant uptake from cyanobacteria, although this N may not come from N<sub>2</sub>-fixation. It should be regarded that the greenhouse assay had no N chemical addition, had more cyanobacteria in the inoculant, more cyanobacterial blooms and no aquatic weeds.

In pots without plants, with and without inoculation, soil inorganic N content was higher in the inoculated pots after 5 weeks (Fig. 3). The increase in inorganic N in soil due to inoculation indicated a release of N of cyanobacterial cells, but most nitrogen should have been mineralized after the maximal nitrogen-requiring stage of rice.

However, the variation in the magnitude of the increase at different periods might be the result of many interacting processes including mineralization-immobilization and losses through various means (Ghosh and Saha 1997). Depending on field conditions, cyanobacteria may have a role in assimilating nitrogen and protecting it from being lost as well as being a major driving force for NH<sub>3</sub> volatilization through diurnal increases in pH. Cyanobacteria may also cause



**Fig. 3** Soil mineral nitrogen (nitrate plus ammonium) evolution after cyanobacterial inoculation. The data are mean of three replicates and the bars correspond to the standard deviations

N loss through stimulation of nitrification–denitrification processes as they affect the depth of the aerobic soil layer through their O<sub>2</sub> input, but more data are required for confirm this assertion (Mandal et al. 1999).

## Conclusions

Rice inoculation at flooding with heterocyst cyanobacteria isolated from Uruguayan ricefields, increases neither rice yield nor the plant N fertilizer recovery, meaning that the inoculant nitrogen fixation was not vital to plant nutrition under these conditions. N-fertilizer recovery by plant and soil system is not different with inoculation.

N use efficiency when fertilizer was applied at sowing is around 20% for these culture conditions, meaning that most of the N uptake comes from the soil. The total N-fertilizer recovery was higher when the fertilizer was split than when applied in a single dose. Plant N-fertilizer uptake was higher when the fertilizer was applied at tillering. Cyanobacterial mineralization under controlled conditions was fast; as cyanobacterial N was detected in plants after 25 days. Moreover 40 days after inoculation non-planted and inoculated soil has more inorganic N than the non-inoculated one.

Soil inorganic N increase occurred five weeks after inoculation coinciding with panicle initiation, date with the lowest plant fertilizer recovery and so, cyanobacterial mineralization occurs after the more N-demanding plant stages. For considering cyanobacterial inoculation in organic rice culture without chemical fertilizer addition, conditions to improve inoculant survival and N<sub>2</sub> fixation must be studied.

**Acknowledgements** This work was supported by IFS (Grant C-2747) and INIA-FPTA No. 108. We thank V. Berriel for total N analysis and A. Bereta for statistical analysis.

## References

- Balandreau J, Roger P (1996) Some comments about a better use of biological nitrogen fixation in rice cultivation. In: Rahnan M, Kumar A, van Hove C, Begum ZNT, Heulin T, Hartmann A (eds) Biological nitrogen fixation associated with rice production. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1–12, ISBN 0–7923 4197-X
- Cassman KJ, Peng S, Olk DC, Ladha JK, Reichardt W, Dobermann A, Singh U (1998) Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from resource management in irrigated rice systems. *Field Crop Res* 56:7–39
- De Datta S, Obcemea W, Chen R, Calabio J, Evangelista R (1987) Effect of water depth on nitrogen use efficiency and nitrogen-15 balance in lowland rice. *Agron J* 79:210–216
- De Datta SK, Buresh RJ (1989) Integrated nitrogen management in irrigated rice. *Adv Soil Sci* 10:143–169

- Fernández-Valiente E, Quesada A, Prospero C, Trillo M, Carreres R, González T (1996) Contribution of biological nitrogen fixation to rice production in Mediterranean rice fields. In: Rahnan M, Kumar A, van Hove C, Begum ZNT, Heulin T, Hartmann A (eds) Biological nitrogen fixation associated with rice production. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 147–157, ISBN 0-7923 4197-X
- Fernández-Valiente E, Ucha A, Quesada A, Leganés F, Carreres R (2000) Contribution of N<sub>2</sub> fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from <sup>15</sup>N-labelled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant Soil* 221:109–114
- Ghosh TK, Saha KC (1997) Effects of inoculation of cyanobacteria on nitrogen status and nutrition of rice (*Oryza sativa* L.) in an Entisol amended with chemical and organic sources of nitrogen. *Biol Fertil Soils* 24:123–128
- IAEA (2001) Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. IAEA-TCS-14, Vienna
- Irisarri P (2006) Role of cyanobacteria as biofertilizers, potentials and limitations. In: A handbook of microbial biofertilizers. The Harworth Press Inc, USA. Chap. 16, pp 417–430, ISBN 1-56022-269-9
- Irisarri P, Gonnet S, Monza J (2001) Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. *J Biotechnol* 91:95–103
- Kundu DK, Ladha JK (1995) Efficient management of soil and biologically fixed N<sub>2</sub> in intensively cultivated rice fields. *Soil Biol Biochem* 27:431–439
- Mandal B, Vlek PLG, Mandal LN (1999) Beneficial effects of blue-green algae and Azolla, excluding supplying nitrogen, on wetland ricefields: a review. *Biol Fertil Soils* 28:329–342
- Norman RJ, Guindo D, Wells BR, Wilson CE (1992) Seasonal accumulation and partitioning of nitrogen-15 in rice. *Soil Sci Soc Am J* 56:1521–1527
- Reddy PM, Roger PA (1988) Dynamics of algal populations and acetylene-reducing activity in five rice soils inoculated with blue-green algae. *Biol Fertil Soils* 6:14–21
- Reynaud PA, Metting B (1988) Colonization potential of cyanobacteria on temperate irrigated soils in Washington State, USA. *Biol Agric Hortic* 5:197–208
- Roger PA, Zimmerman WJ, Lumpkin T (1993) Microbiological management of wetland rice fields. In: Baline Meeting F Jr, Dekker M (eds) Soil microbial technologies. Basel Hong Kong, New York, pp 417–455
- Roger PA (1996) Fauna. In: Smith WH (ed) Biology and management of the floodwater ecosystem in ricefields. IRRI & ORSTOM Pub., Manila, 57–78, ISBN 971220068X
- Roger PA, Ladha JK (1992) Biological N<sub>2</sub> fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant Soil* 141:41–55
- Sheehy J, Mnzava M, Cassman K, Mitchell P, Publico P, Robles R, Samonte H (2004) Temporal origin of nitrogen in the grain of irrigated rice in the dry season: the outcome of uptake, cycling, senescence and competition studied using <sup>15</sup>N-point placement technique. *Field Crop Res* 89:337–348
- Sinha RP, Häder D-P (1996) Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 64:887–896
- Stevens G, Hefner S, Gladbach T (2001) Effect of nitrogen timing and rates on tillering and yield of non-till water-seeded rice. *Commun Soil Sci Plant Anal* 32:421–428
- Tarlera S, Gonnet S, Irisarri P, Menes J, Fernández A, Paolino G, Travers D, Deambrosi E (2006) Nitrification and denitrification associated with N<sub>2</sub>O production in a temperate N-fertilized irrigated Uruguayan ricefield. In: Modern multidisciplinary applied microbiology. Exploiting microbes and their interactions. Ed. Wiley-VCH Verlag, pp 416–420, ISBN 3-527-31611-6
- Tomaselli L, Giovannetti L (1993) Survival of diazotrophic cyanobacteria in soil. *World J Microbiol Biotechnol* 9:113–116
- Watanabe I (1986) Nitrogen fixation by non-legumes in tropical agriculture with special reference to wetland rice. *Plant Soil* 90:343–357
- Wilson CE, Norman RJ, Wells BR (1989) Seasonal uptake patterns of fertilizer nitrogen applied in split applications to rice. *Soil Soc Am J* 53:1884–1887
- Zaccaro MC (2000) Plant growth-promoting cyanobacteria. In: Proceedings of the 5th International PGPR Workshop, Córdoba, Argentina. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/zaccaro.pdf> (viewed 8-6-2006)



# Differential Response to Moderate UV-B Irradiation of Two Heterocystous Cyanobacteria Isolated from a Temperate Ricefield

Germán Pérez, Soledad Doldán, Omar Borsani, Pilar Irisarri

Departamento Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Email: [irisarri@fagro.edu.uy](mailto:irisarri@fagro.edu.uy)

Received December 15th, 2011, revised January 4th, 2012, accepted January 15th, 2012

## ABSTRACT

In cyanobacteria both photosynthesis and nitrogen fixation can be affected by UV radiation. Two of the most abundant heterocystous cyanobacteria isolates from a temperate ricefield in Uruguay belonging to *Anabaena* and *Calothrix* genus were exposed for 1 or 3 hours to UV-B dosis similar to those to which they are exposed in summer. *Anabaena* survival after 1 h of UV-B exposure was 10% whereas in *Calothrix*'s was 30%. Both the quantum yields of photosystem II fluorescence and O<sub>2</sub> photoevolution decreased with time of UV-B exposure for *Calothrix* and only till 1 h for *Anabaena*. Only the *Calothrix* strain presented phycoerithryn as antenna pigment and constitutive UV-B screening mycosporine like aminoacids. In the *Anabaena* strain, nitrogenase activity was drastically reduced with UV-B irradiation but in *Calothrix* was not affected. Proline content and lipid peroxidation increased after 3 hours of UV-B exposure only in *Anabaena* sp. The antioxidant enzyme activities evaluated followed different trends for both isolates, with an increase in superoxide dismutase activity in the *Calothrix* isolate. These results show that the two nitrogen-fixing cyanobacteria studied have different responses to UV-B radiation and that cyanobacteria diversity may be considered when selecting strains to be used as biofertilizers.

**Keywords:** Cyanobacteria; Antioxidant Responses to UV-B; Mycosporine; Nitrogenase Activity

## 1. Introduction

The current trend in the decrease of stratospheric ozone from anthropogenic inputs of chlorinated fluorocarbons has caused an increase of ultraviolet-B radiation (UV-B, 290 - 320 nm) reaching the biosphere. Site-specific ozone reductions have been reported over South America as far as 30°S as a consequence of the transport of air masses with low ozone concentrations after the break-up of Antarctic vortex circulation [1]. High doses of UV-A/B radiation can also pass through the water column and have deleterious effects on aquatic systems [2]. UV-B radiation is the one that produces the most severe cellular damage due to its direct effects on DNA and proteins and indirectly by the reactive oxygen species (ROS) production [3]. The damage, however, is dependant of the irradiance/dose received by the cells.

Cyanobacteria comprise the biggest and most widely distributed group of photosynthetic prokaryotes. They absorb solar radiation to drive photosynthesis and nitrogen fixation in some cases, being exposed to high doses of UV radiation. The main biochemical and physiological processes altered by UV radiation in these bacteria are surviving rates, pigmentation, motility, O<sub>2</sub> photoevo-

lution, CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> fixation, and the phycobiliprotein content. Many cyanobacteria have developed mechanisms to prevent the toxic effects caused by UV. Among these, DNA damage repair mechanisms, accumulation of detoxifying and antioxidant enzymes or synthesis of UV-protectants compounds [4].

Among the nitrogen fixing cyanobacteria, the heterocystous forming ones seem to be the most abundant in the water column and on the surface of rice paddy fields [5]. The fact that heterocystous forming cyanobacteria can assimilate CO<sub>2</sub> and fix N<sub>2</sub>, make them suitable to be used as biofertilizers [6]. A rice inoculation assay using heterocystous-cyanobacteria in Uruguay was not successful [7], suggesting that conditions to improve inoculant survival must be studied. The inoculant was applied at flooding stage and so cyanobacteria received levels of UV radiation similar to those reported at the same latitude for shallow lagoons in Uruguay [8]. Light is the most variable of the resources essential for photosynthesis in aquatic environments varying with greatest amplitude on short time scales from effects of vertical mixing, cloud cover, and the diel cycle of sunlight. Thus, individual cells must cope with a wide variability in light on

time scales shorter than their lifetime [9].

Under the hypothesis that diverse cyanobacteria isolated from the same site may cope with UV radiation in a different form, the aim of this work was to study the UV-B response at laboratory conditions of two of the most abundant cyanobacterial isolates from a temperate rice paddy field [10] at doses to which they are normally exposed. Estimation of growth, their physiological status and some of their UV-protective mechanisms were studied.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Organisms and Growth Conditions

The filamentous heterocystous cyanobacteria *Calothrix* sp. BI22 and *Anabaena* sp. BI42 were isolated from Uruguayan rice paddy fields [10]. The cultures were axenically grown in nitrogen free BG 11 medium [11] buffered with 10 mM HEPES, pH 7.6 at  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with white light supplied by fluorescent lamps providing a photosynthetic photon flux density of  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Exponentially growing cultures were used for the different experiments. Cultures were sampled under sterile conditions after homogenization with a Potter pestle and biomass was estimated as dry weight. Unless otherwise stated, cultures with an initial dry weight of about  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  were used in all experiments.

### 2.2. UV Treatment

A well homogenised culture suspension of each cyanobacterium was poured into open Petri dishes (diameter 22 cm). The cultures were exposed directly and only to artificial UV-B ( $0.034 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) and UV-A ( $15.54 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) during 1 h and 3 h with constant shaking to avoid self-shading. UV-B irradiation was provided by a Hi-Tech lamp G25T8E, Japan. The irradiance of the light source was determined with an IL1400A radiometer/photometer (International Light Inc.) equipped with UVAR and UVBR sensors.

### 2.3. Survival

The survival of the irradiated and control organisms was studied on agar plates. After irradiating the cultures, aliquots of  $100 \mu\text{L}$  were diluted to 1 mL with BG11 medium and transferred to nitrogen free BG11 sterile solid plates and grown in the same conditions described above. After 10 days of incubation, colonies were counted under a binocular microscope and the survival was calculated by the colony numbers of test samples (Nt) divided by the control samples (Nc) ( $\text{survival \%} = \text{Nt}/\text{Nc} \times 100$ ).

### 2.4. Absorption Spectra

Culture suspensions were homogenized in a Potter pestle

and then immobilized in agarose 1% (w/v) in a 3 mL-quartz cuvette. A scanning spectrum (300 - 750 nm) of immobilized cells exposed for different periods of time to the beam of the spectrophotometer at 280 nm was obtained, according to [12].

Phycobiliproteins were extracted according to [13].

### 2.5. Fluorescence Emission Spectrum

The emission spectrum was measured with a spectrofluorophotometer (RF-1501, Shimadzu) at room temperature with an excitation wavelength of 445 nm and emission wavelength between 600 and 780 nm.

### 2.6. Chlorophyll Fluorescence Parameters

The *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence from both cyanobacteria cultures was measured with a FMSI fluorometer (Hansatech Instrument Ltd., King's Lynn, UK) using saturating actinic light ( $8000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for 8 s as described by [14]). Prior to the measurement the cyanobacteria were adapted 30 min to darkness. Fluorescence parameters were calculated as described by [15].

### 2.7. Photosynthetic Oxygen Evolution

Photosynthesis was measured as  $\text{O}_2$  evolution with a Clark-type  $\text{O}_2$  electrode (Hansatech Instruments Ltd.) as described in [10]. Two mL aliquots of cell suspensions which were exposed to UV treatments were placed in a  $27^{\circ}\text{C}$  controlled cuvette and illuminated with a quantum flux density of  $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 2.8. Extraction and Analysis of Mycosporine-Like Aminoacids (MAA)

Cells were harvested by centrifugation at 8000 g for 5 min at room temperature. Pellets were first incubated with methanol 20% (v/v) at  $45^{\circ}\text{C}$  for 2.5 h and then centrifuged (6000 g; 5 min) at  $6^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ . The process was repeated twice. The extracts were cleared using nitrocellulose membranes ( $0.45 \mu\text{m}$ ) and characterized using a HPLC system (Shimadzu SPD-10A UV-VIS detector, Kyoto, Japan) equipped with a LiChrosorb RP-18 column. The wavelength for detection was 330 nm at a flow rate of 1.0 mL/min at  $25^{\circ}\text{C}$  and a mobile phase of 0.2% acetic acid. The separated aminoacids were detected at 330 nm with a photodiode array [16]. Identification of MAAs was done by comparing the absorption spectra and retention times with standards such as *Corallina officinalis* (shinorine and palythine) and *Porphyra* sp. (porphyra-334 and shinorine). These standards were kindly provided by Dr. D.-P. Häder from the Alexander Universität (Erlangen, Germany). The database used for identification of the MAAs was <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/index.html>.

## 2.9. Nitrogenase Activity

To determine the response of nitrogenase activity to the exposure to UV light, an acetylene reduction assay (ARA) was performed in 10 mL aliquots of cell suspensions, placed in 22 mL vials after 1 and 3 hours of UV exposition. The incubation time with 10% acetylene in air was 45 min [10]. Ethylene formation was followed with a HP 5890 gas chromatograph equipped with a Porapack N column. Nitrogenase activity was expressed as  $\mu\text{mol ethylene mg}^{-1} \text{ dry weight} \cdot \text{h}^{-1}$ .

## 2.10. Lipid Peroxidation

The formation of malondialdehyde (MDA) was used as indicator of lipid peroxidation. The determination of MDA by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method was performed as described by [17] at 532 nm absorbance. Lipid peroxidation was expressed as nmoles of MDA per milligram dry weight using an extinction coefficient of  $156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [18].

## 2.11. Proline Content

Proline was extracted and quantified according to [19].

## 2.12. Antioxidant Enzymatic Activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed spectrophotometrically by monitoring inhibition of xanthine oxidase (XO; 1.1.3.22)-dependent reduction of  $10 \mu\text{M}$  ferricytochrome *c* [20]. The reaction was monitored at 550 nm in 50 mM potassium phosphate,  $100 \mu\text{M}$  EDTA, and  $50 \mu\text{M}$  xanthine, pH 7.8. One unit of SOD was defined as the activity that could inhibit the XO-dependent reduction of ferricytochrome *c* by 50%, measured as inhibition of the rate of increase in absorbance at 550 nm compared with a control rate, established using sufficient XO. Ferricytochrome *c* reduction of  $0.025 \text{ A}_{550}/\text{min}$  was done at  $25^\circ\text{C}$ .

Catalase (CAT) activity was determined essentially as described by [21] by measuring the decline in levels of hydrogen peroxide spectrophotometrically at 240 nm. One unit was defined as the activity that decomposed one micromole of hydrogen peroxide per minute at  $25^\circ\text{C}$  at pH 7.0.

Ascorbate peroxidase (APX) activity was followed by decrease in absorption at 290 nm for 3 min (extinction coefficient  $2.8 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). The reaction mixture contained phosphate buffer 100 mM (pH 7.5), ascorbate 0.5 mM and  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2 mM [22].

For protein quantification cultures were centrifuged ( $6000 \text{ g}$  for 10 min) and pellets were resuspended in an extraction buffer (100 mM Tris; 50 mM EDTA; NaCl 100 mM; PMSF 1% fc; pH 8). The protein extract was

quantified according to [23] and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until further processing.

## 2.13. SOD Detection

SOD isozymes were analyzed on a non-denaturing polyacrylamide gel, using in-gel activity assays and with isozyme-specific inhibitors previously described by [24], and using  $40 \mu\text{g}$  of protein in a given analysis [25].

## 2.14. Statistical Analysis

Analysis of variance and a t-test were used to establish differences among the different radiation treatments and strains ( $n = 3$  or 4). All experiments described were conducted independently at least twice. A confidence level of 95% was used in all analysis.

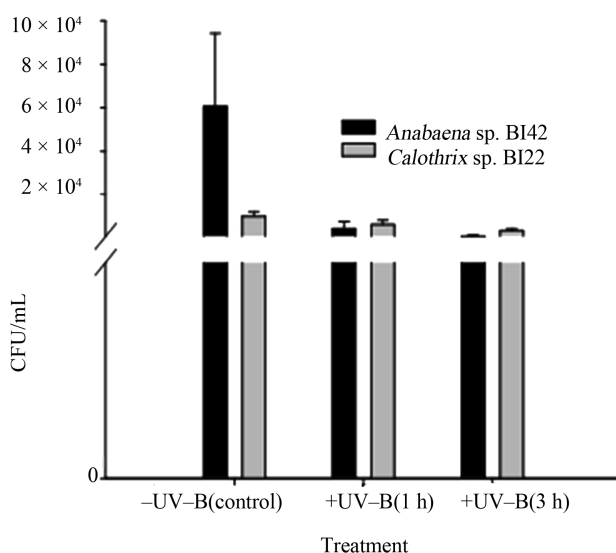
## 3. Results

### 3.1. Cyanobacterial Survival to UV-B

Growth responses of the two tested cyanobacteria *Anabaena* sp. BI42 and *Calothrix* sp. BI22 after UV-B radiation were inhibited in a different trend. *Anabaena* BI42 sp. showed after an hour of exposure a decrease of its survival of near 90% and reached almost a 100% after 3 hours of exposure. On the other hand, the survival decrease of *Calothrix* sp. BI22 was near 50% in the first hour of irradiation and reached a 70% after 3 hours of exposure (Figure 1).

### 3.2. Spectral Properties of Photosynthetic Pigments

The absorption spectrum of photosynthetic pigments in



**Figure 1. Growth of cyanobacteria after different times of exposure to UV-B.**

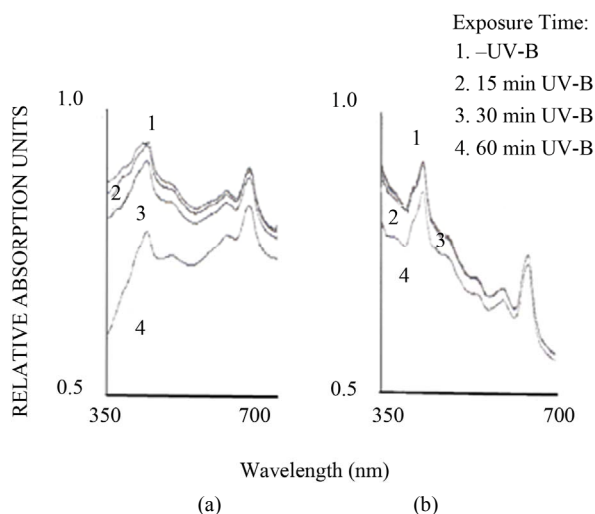


response to moderate UV-B stress (**Figure 2**) showed that maximum light was absorbed in two distinct regions *i.e.* from wavelength 400 - 500 nm and 600 to 700 nm. In *Anabaena* sp. BI42 the spectrum showed absorption maxima at 683, 630, 501 and 443 nm, corresponding to the photosynthetic pigments Chl *a* (red peak), phycocyanin, caroten and Chl *a* (Soret band) respectively. The absorption maxima for *Calothrix* sp. BI22 corresponded to 681, 629, 572, 503 and 403 nm with an additional phycoerythrin peak. In both cyanobacteria, the absorption of light decreased in both regions with the increase in time of UV-B exposure from the beam of the spectrophotometer (**Figures 2(a)** and **(b)**). In the case of *Anabaena*, carotenoids that were the more affected pigments, presented a higher decrease in absorbance with exposure time to UV-B radiation than in *Calothrix*.

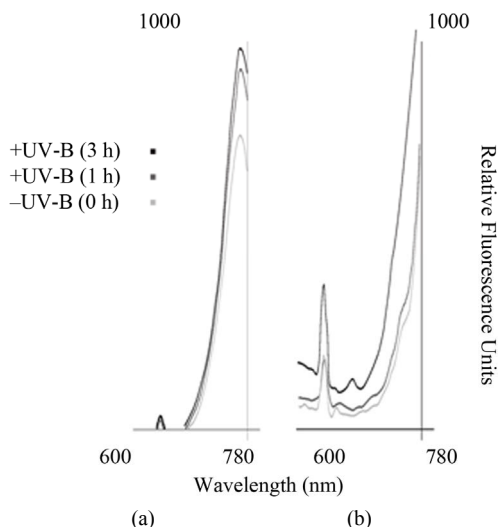
The fluorescence emission spectra of *Anabaena* sp. BI42 and *Calothrix* sp. BI22 and are shown in **Figures 3(a)** and **(b)** respectively, after different times of exposure to UV-B irradiation. The fluorescence emission peak at 670 nm, monitored at an excitation wavelength of 445 nm increased with duration of UV-B irradiation for both cyanobacteria isolates. There was no shift in the peaks observed but an increase in their value due to exposure UV-B.

### 3.3. Chlorophyll *a* Fluorescence and O<sub>2</sub> Photoevolution

The optimum quantum yield of PSII (Fv/Fm) of the control (before exposure treatment) already showed a significant difference in the photosynthetic capacity between the two isolates ( $p < 0.01$ ). Photosynthetic efficiency was higher in *Calothrix* sp. BI22 ( $0.453 \pm 0.017$ ) than in *Anabaena* BI42 sp. ( $0.223 \pm 0.015$ ).



**Figure 2.** Absorption spectra of cells of *Anabaena* sp. BI42 and *Calothrix* sp. BI22, (a) and (b) respectively, obtained after different time of exposure to the 280 nm beam of the spectrophotometer.



**Figure 3.** Impact of UV-B on emission fluorescence spectra of *Anabaena* sp. BI42 and *Calothrix* sp. BI22, (a) and (b) respectively. Cells were excited at 445 nm after exposure to UV-B for 0, 1 and 3 h.

Fm/Fv significantly decreased ( $p < 0.05$ ) with the time of exposure in *Calothrix* sp. BI22 to UV-B (**Figure 4**). There was a decline of 32% of the quantum yield of PSII after 3 hours of exposure. While in *Anabaena* the decrease was only significantly different in the first hour ( $p < 0.05$ ). The Fv/Fm in *Anabaena* reached the same value as the control sample when exposed to 3 hours to UV radiation.

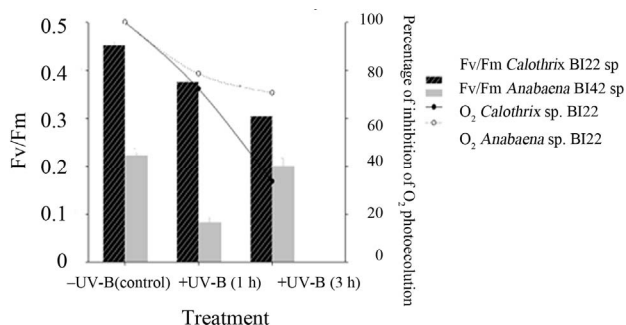
The O<sub>2</sub> photoevolution was more drastically reduced in *Calothrix* BI22 sp. than in *Anabaena* BI42 sp. (**Figure 4**).

### 3.4. Mycosporine Like Aminoacids

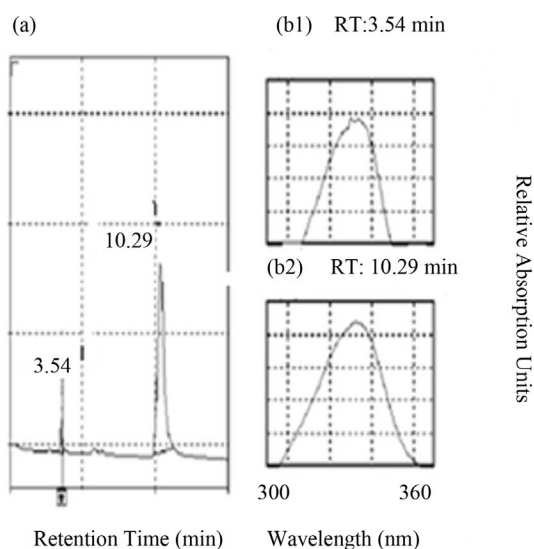
The HPLC analysis revealed the presence of two MAAs in *Calothrix* sp. BI22 (**Figure 5**). According to [26] these MAAs could be palythol and mycosporine-2-glycine. Their retention times were 3.54 and 10.29 min respectively and their absorption maxima were 330 and 332 nm respectively. The content of these MAAs, 3.7 and 0.5 nmol·g·DW<sup>-1</sup> respectively did not increase significantly with UV-B exposure. Instead, neither any peak nor an induction of any MAAs was observed in *Anabaena* sp. BI42 (**Figure 5**).

### 3.5. Nitrogenase Activity

Rates of nitrogen fixation (**Table 1**), measured as nitrogenase activity, were not significantly altered in *Calothrix* sp. BI22 due to UV-B radiation. Instead, *Anabaena* sp. BI42 showed a significant reduction at the very first hour of exposure ( $p < 0.05$ ) which represents a 55% decline in the nitrogen fixation of this strain. When the culture of *Anabaena* sp. BI42 was irradiated for 3 hours, the nitrogenase activity drastically decreases (**Table 1**).



**Figure 4.** Photosynthetic parameters measured for both isolates *Calothrix* sp. BI22 and *Anabaena* sp. BI42 in the control or irradiated with UV-B for 1 or 3 h. The maximum photochemical efficiency of PSII reaction centers measured as the ratio FV/Fm and percentage of inhibition of O<sub>2</sub> photoevolution after exposure for different times to UV-B. Results of FV/FM are reported as mean of three replicates  $\pm$  standard error.



**Figure 5.** (a) HPLC chromatogram showing the retention times and wavelength of MAAs (palythanol and mycosporine-2-glycine) in *Calothrix* sp. BI22. (b1) Absorption spectrum showing the maximum absorbance for MAA palythanol (as purified by HPLC), at 332 nm and retention time 3.32 min. (b2) Absorption spectrum showing the maximum absorbance for MAA mycosporine-2-glycine, (as purified by HPLC), at 332 nm and its retention time was 10.08 min.

### 3.6. Lipid Peroxidation

The level of lipid membrane damage measured as TBARS was not significantly affected by UV-B exposure in *Calothrix* sp. BI22 (Table 1). Only after 3 hours of exposure, the level of damage became significantly different from the control values in *Anabaena* sp. BI42 (Table 1).

### 3.7. Proline Content

Quantification of proline showed that after 3 hours of

exposure its accumulation became significantly different to control samples of *Anabaena* sp. BI42. However, proline content showed no significant difference during the experiments in *Calothrix* sp. BI22 (Table 1).

### 3.8. Antioxidant Enzymatic Activities

Both strains had changes in their antioxidant enzymes activities in response to UV-B exposure (Figure 6). SOD activity showed an opposite trend between the cyanobacterial strains; a significant decrease in *Anabaena* sp. BI42 and a significant increase in the enzymatic activity in *Calothrix* sp. BI22 after 3 hours of exposure to UV-B. On the other hand, in *Anabaena* BI42 and *Calothrix* sp. BI22, their catalase activity significantly increased after one hour of exposure and dropped down its activity after 3 hours of irradiation. There was no significant change in the APX activity in both strains (Figure 6).

Assays on SOD activity by non-denaturing PAGE gels showed that *Anabaena* sp. BI42 had two isoforms and *Calothrix* sp. BI22 one. There was no induction of any new isoform of this enzyme during the exposure to UV-B radiation (Figures 6(c) and (d)). The pre-incubation with inhibitors such as KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed that both strains have a Fe-dependent SOD isoform (data not shown) (Figure 7).

## 4. Discussion

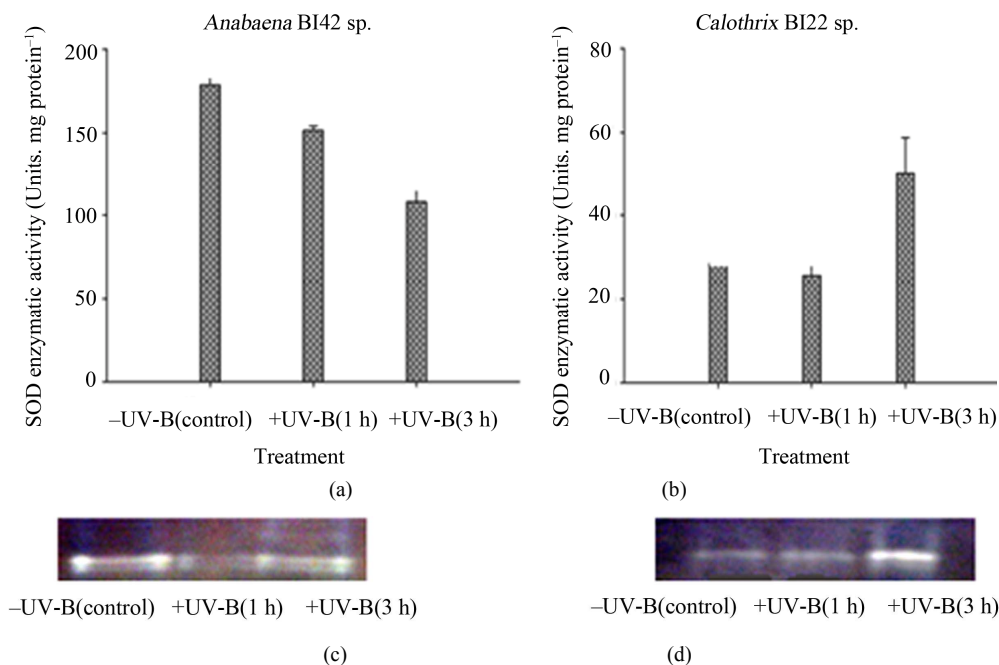
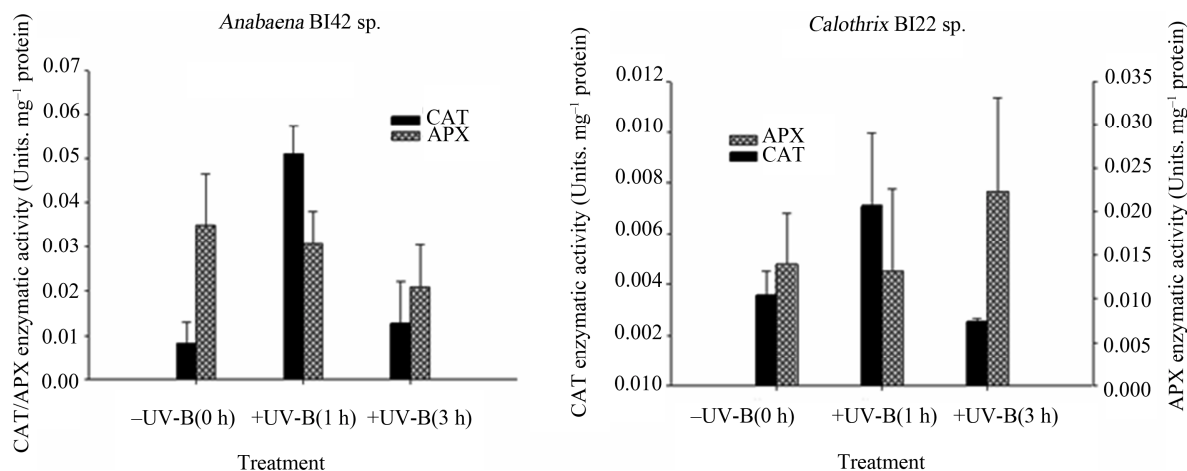
Cyanobacteria harvest light energy during the process of photosynthesis and assimilate it into carbon compounds. Any adverse effect of UVB may severely affect photosynthesis and related metabolic processes and overall growth performance of cyanobacteria. Although the survival of both cyanobacteria isolates tested decreased after exposure to UV-B irradiation, the responses were different. Previous reports stated that the differences could in part be explained on the basis of antioxidant defenses and DNA repair mechanisms present in each microorganism or simpler ones as morphological features such as presence of sheath [27,28]. For instance, *Calothrix* sp. BI22 has a mucilaginous sheath (data not shown) observed by optic microscopy whereas *Anabaena* sp. BI42 lacks it. It must be considered that in this work the UV lamp used provided almost exclusively UV-B light and PAR was not applied simultaneously during the irradiation period. Field conditions are quite different and so these results must not be extrapolated. For example, DNA-repair mechanisms included photoreactivation by photolyase after absorption of light energy at 400 nm or long wavelength UV-A [4].

The laboratory studies presented here show that both photosynthesis and nitrogen fixation in *Anabaena* sp. BI42 are affected by short exposure times to UV-B, while in *Calothrix* sp. BI22 only photosynthesis decreased.

**Table 1.** Effect of different times of exposure to UV-B on nitrogenase activity, proline content and lipid peroxidation in *Anabaena* sp.BI42 and *Calothrix* sp.BI22.

UV-B treatment (h)	Nitrogenase activity ( $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{DW}\cdot\text{h}^{-1}$ )		Proline content ( $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{mg}\cdot\text{DW}^{-1}$ )		TBARS ( $\text{nmol}\cdot\text{g}\cdot\text{DW}^{-1}$ )	
	<i>Anabaena</i> sp. BI42	<i>Calothrix</i> sp. BI22	<i>Anabaena</i> sp. BI42	<i>Calothrix</i> sp. BI22	<i>Anabaena</i> sp. BI42	<i>Calothrix</i> sp. BI22
0	$0.69 \pm 0.18^a$	$0.18 \pm 0.04^b$	$1.80 \pm 0.34^a$	$1.1.67 \pm 0.55^a$	$29.5 \pm 14.2^a$	$6.7 \pm 3.2^a$
1	$0.31 \pm 0.05^b$	$0.39 \pm 0.20^b$	$2.07 \pm 0.43^a$	$1.57 \pm 0.65^a$	$20.6 \pm 8.5^a$	$7.5 \pm 2.5^a$
3	$0.02 \pm 0.01^c$	$0.28 \pm 0.02^b$	$3.04 \pm 0.30^a$	$1.64 \pm 0.05^a$	$60.0 \pm 4.0^b$	$6.1 \pm 1.6^a$

Values (means  $\pm$  standard deviation) followed by different letters were significantly different at  $p < 0.01$ .

**Figure 6.** Superoxide dismutase (SOD) *in vitro* activities in *Anabaena* sp. BI42 (a) and *Calothrix* sp. BI22 (b) after different times of exposure to UV-B. Results are reported as mean of three replicates  $\pm$  standard error. Identification of SOD *in-gel* activities in *Anabaena* sp. BI42 (c) and *Calothrix* sp. BI22 (d) for the control and cells irradiated with UV-B for 1 and 3 h.**Figure 7.** APX and CAT activities in *Anabaena* sp. BI42 (a) and *Calothrix* sp. BI22 (b) exposed to UV-B for 0, 1 and 3 h. Results are reported as mean of three replicates  $\pm$  standard error.

#### 4.1. Pigmentation and Photosynthesis

Several studies as this one suggest that phycobiliproteins, chlorophyll and carotenoids are negatively influenced by UV-B radiation [29].

The increase in fluorescence emission peaks with the UV-B treatments (**Figure 3**) was not accompanied by a shift of the peak to shorter wavelengths as has been reported for larger exposure to UV-B [12]. However, the observed slight decay in fluorescence intensity was probably due to less efficiency in light capture in UV-B irradiated cells and loss in effectiveness of energy transfer to the photosynthetic reaction center.

Photosynthetic oxygen production declined with artificial UV-B radiation in both isolates investigated. It could be possible that structural changes within the photosynthetic apparatus were induced by short exposure times which affected the energy transfer within the antenna complex. Photosynthesis was more affected in *Calothrix* sp. BI22, as showed by the fluorescence spectra and O<sub>2</sub> photoevolution. Photosynthetic quantum yield that was determined by pulse amplitude-modulated fluorometry can provide information on both photosynthesis and overall acclimation status [30]. Quantum yields of PSII fluorescence showed a decline upon UV-B exposure in *Calothrix* sp. BI22 (**Figure 4**). This is consistent with previous studies [31] where accumulation of un-repaired damage over time in cultures exposed to UVR is suggested. A possible explanation is that essential proteins of the PSII like D1 are damaged during exposure [32-34] and probably this explains what was observed in *Anabaena* sp. BI42. Phycobiliproteins fluorescence may also be contributing to photosynthetic quantum yield as both cyanobacteria possessed different phycobiliproteins [30].

#### 4.2. Nitrogen Fixation

The results of nitrogenase activity (**Table 1**) showed that in *Anabaena* sp. BI42 this process was drastically inhibited after 3 hours of exposure (near 100%). This is in accordance to previous studies on other strains of *Anabaena* sp., but using higher doses of UV-B [29,35] (Newton *et al.*, 1979, Lesser, 2008). In *Calothrix* sp. BI22, the N<sub>2</sub> fixing activity was not affected by UV-B exposure in any treatment. Nitrogen fixation requires ATP and reductant for its activity that come from photosynthesis. Even though photosynthesis (Fv/Fm and O<sub>2</sub> photoevolution) was altered in *Calothrix* sp. BI22, there is evidence that cyanobacteria contain sufficient endogenous content of reductant and ATP to support the nitrogenase activity [36]. However, [37] showed that nitrogenase inactivation by UV-B is caused by direct damage to nitrogenase polypeptide. They also proved that restoration of the activity depends on *de novo* synthesis of the enzyme rather than the cellular content of ATP and reductant.

#### 4.3. Mycosporine Like Aminoacids

Synthesis of UV-absorbing compounds, such as mycosporine amino acids (MAAs), is an important mechanism preventing UV photodamage. The degree of protection by MAAs depends on the type of aminoacid, location (cytoplasm or extracellular glycan) and species [38]. *Calothrix* sp. BI42 had two types of MAAs, palythynol (88%) and mycosporine-2-glycine (12%). The same kind of MAAs had been found in *Nostoc punctiforme* in colonies exposed to high solar radiation [39]. MAA-Gly is reported to be located in the extracellular glycan [40]; [41]. Apart from the benefits from being in the outer membrane, MAA-Gly is reported to give additional protection because it can act as a radical quencher [42]. The experimental conditions used in this study did not induce any increase or variation in *Calothrix*'s MAAs content. In other studies MAAs synthesis was also influenced by the irradiation conditions [26] and higher doses or longer times of irradiation increased MAAs content [31]. A constitutive level of MAAs can appear in all growth conditions of cyanobacteria as observed in *Calothrix* sp. BI42. This cyanobacterium grows in aggregates which is said to substantially increase the screening efficiency of MAAs [43]. *Anabaena* sp. BI22 did not show the presence of any MAAs nor any induction of them with exposure to the UV-B doses assayed. Other surveys reported that from 22 cyanobacterial isolates, only 13 were found to contain MAAs [44]. However, [16] found in an *Anabaena* sp. isolated from an Indian rice paddy-field the presence of shinorine. None of the strains tested showed the presence of scytonemin (data not shown) which is said to be induced by UV-A irradiation and other type of stresses [45].

#### 4.4. Antioxidant Potential

*Anabaena* sp. BI42, after 3 hours of exposure showed a significant increase of lipid membrane damage measured as TBARS (**Table 1**). This provides indirect evidence of increased photoxidative damage stress by ROS after UV-B exposure in this cyanobacterium as has been reported before [27,46]. There was no significant change in lipid peroxidation in *Calothrix* sp. BI22.

Proline is an iminoacid essential to primary metabolism whose accumulation has been related to unfavourable conditions in plants [47] and cyanobacteria [48,49]. According to [50] intracellular proline detoxifies harmful ROS directly rather than improving key antioxidant enzymes. Our results are in accordance with this, because *Anabaena* showed an increase in TBARS and in proline content after 3 hours of exposure. No effect in the proline content was seen in *Calothrix* sp. BI22 (**Table 1**).

During oxidative stress ROS triggered the activity of several antioxidative enzymes such as SOD (EC 1.15.1.1),

CAT (EC 1.11.1.6), and APX (EC 1.11.1.11). High activity of these enzymes in cyanobacteria could be linked to stress tolerance efficiency [46].

As has been stated by [51], cyanobacteria can have iron-containing SOD (cytosolic) and manganese-containing SOD (thylacoid-bound) isoforms. The strains tested have both a Fe-SOD isoform and no other isoform was induced due to the experimental conditions (**Figures 6(c)** and **(d)**). SOD activities have been shown to change dramatically in response to conditions that favour the formation of superoxide [52]. *Calothrix* sp. BI22 showed a significant increase of its activity after the maximum exposure time (**Figure 6(b)**). [53] reported that  $O_2^-$  is the first ROS generated as a consequence of UV-B stress. Like in other studies [54,55], the result obtained supports the fact that SOD plays an important role in protecting *Calothrix* sp. BI42 from UV-B stress. However, *Anabaena* sp. BI42 showed a decrease in the same conditions (**Figure 5(a)**). It has also been reported that only UV-B produced the decrease of SOD activity in microalgae [56,57] found that in plants SOD activity can increase or diminish according to the species, UV-B dose and the presence or not of concomitant PAR or UVA radiation.

CAT activity had a significant increase in both strains after one hour of exposure to UV-B (**Figures 7(a)** and **(b)**). After 3 hours of irradiation, levels of CAT activity fell down reaching the values observed in the Control treatment in both strains. This result has been reported before [54,58] and inactivation of CAT due to UV-B is as consequence of photoinactivation and degradation [59] of the haem group in CAT. According to [60], UV-B inhibition of CAT could be a survival strategy in order to prevent accumulation of  $H_2O_2$  in the cell.

UV-B irradiation did not significantly affect the APX activity in both strains (**Figures 7(a)** and **(b)**). It seems probable that in this moderate UV-B irradiation study, APX is not involved in the protective mechanisms against it in both cyanobacterial strains.

Many effects reported in the literature indicate species-specific responses to UVR. In this case, the two strains studied under laboratory conditions had different potential survival rates that can be partially explained by the synthesis of UV absorbing compounds and their antioxidant potential.

## 5. Conclusions

Two cyanobacteria strains isolated from the same rice field had different responses to UV-B irradiation doses comparable to the natural solar UV radiation reaching Uruguay's latitude during rice growing season. Both photosynthesis and nitrogen fixation were affected by moderate UV-B radiation in the *Anabaena* isolate. *Calothrix* sp. BI22 seems to have a better and wide suite of protective mechanisms which include constitutive adap-

tations like presence of a sheath or MAAs. It also showed a better antioxidant response to UV-B which may be involved in the successful scavenging of ROS and protection of physiological processes of this cyanobacterium.

All in all these results indicate that *Calothrix* sp. BI22 may be a better candidate than *Anabaena* sp. BI42 to be used as an inoculant in Uruguayan rice paddy fields when considering UV-B thriving strategies.

## 6. Acknowledgements

Financial assistance was from Consejo Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Universidad de la República). We thank Dr. D.-P. Häder for sending us his papers and providing MAAs standards and Dr. J. Monza and P. Díaz for their suggestions.

## REFERENCES

- [1] V. L. Orce, A. Paladini and E. W. Helbling, "Radiación Ultravioleta y Ozono Atmosférico: Influencia del Agujero de Ozono en Argentina," In: G. R. Forno and F. M. Andrade, Eds., *Naturaleza y Efectos de la Radiación Ultravioleta y la Capa de Ozono*, Instituto de Investigaciones Físicas-UMSA, La Paz, 1997, pp. 31-41.
- [2] Y.-Y. He, M. Klisch and D.-P. Häder, "Adaptation of Cyanobacteria to UV-B Stress Correlated with Oxidative Stress and Oxidative Damage," *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 76, No. 2, 2002, pp. 188-196.
- [3] D.-P. Häder, H. D. Kumar, R. C. Smith and R. C. Worrest, "Effects of Solar UV Radiation on Aquatic Ecosystems and Interactions with Climate Change," *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 10, No. 3, 2007, pp. 267-285.
- [4] R. P. Sinha and D.-P. Häder, "UV-Protectants in Cyanobacteria," *Plant Science*, Vol. 174, No. 3, 2008, pp. 278-289. doi:10.1016/j.plantsci.2007.12.004
- [5] A. Vaishampayan, R. P. Sinha, D.-P. Häder, T. Dey, A. K. Gupta, U. Bhan and A. L. Rao, "Cyanobacterial Biofertilizers in Rice Agriculture," *Botanical Review*, Vol. 67, No. 4, 2001, pp. 453-516. doi:10.1007/BF02857893
- [6] P. Irisarri, "Role of Cyanobacteria as Biofertilizers: Potentials and Limitations," In: M. K. Rai, Ed., *Handbook of Microbial Fertilizers*, The Haworth Press Inc., Binghamton, 2006, pp. 417-430.
- [7] P. Irisarri, S. Gonnet, E. Deambrosi and J. Monza, "Cyanobacterial Inoculation and Nitrogen Fertilization in Rice," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 23, No. 2, 2007, pp. 237-242. doi:10.1007/s11274-006-9219-0
- [8] L. Aubriot, D. Conde, S. Bonilla and R. Sommaruga, "Phosphate Uptake Behavior of Natural Phytoplankton during Exposure to Solar Ultraviolet Radiation in a Shallow Coastal Lagoon," *Marine Biology*, Vol. 144, No. 4, 2004, pp. 623-631. doi:10.1007/s00227-003-1229-y
- [9] T. D. B. MacKenzie, R. A. Burns and D. Campbell, "Carbon Status Constrains Light Acclimation in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*," *Plant Physiology*, Vol.



- 136, No. 2, 2004, pp. 3301-3312.  
[doi:10.1104/pp.104.047936](https://doi.org/10.1104/pp.104.047936)
- [10] P. Irisarri, S. Gonnet, E. Deambrosi and J. Monza, "Diversidad de Cyanobacterias con Heterocisto en Suelos Cultivados con Arroz," *Agrociencia*, Vol. 1, No. 3, 1999, pp. 44-49.
- [11] R. Rippka, J. Deruelles, J. B. Watterbury, M. Herdman and R. Y. Stainer, "Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria," *Journal of General Microbiology*, Vol. 111, No. 1, 1979, pp. 1-61.
- [12] V. A. Donkor and D.-P. Häder, "Effects of Ultraviolet Irradiation on Photosynthetic Pigments in Some Filamentous Cyanobacteria," *Aquatic Microbial Ecology*, Vol. 11, No. 2, 1996, pp. 143-149. [doi:10.3354/ame011143](https://doi.org/10.3354/ame011143)
- [13] A. Benett and L. Bogorad, "Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga," *Journal of Cell Biology*, Vol. 58, No. 2, 1973, pp. 419-435. [doi:10.1083/jcb.58.2.419](https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419)
- [14] D.-P. Häder, M. Lebert, R. Marangoni and G. Colombetti, "ELDONET-European Light Dosimeter Network Hardware and Software," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 52, No. 1-3, 1999, pp. 51-58. [doi:10.1016/S1011-1344\(99\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00102-5)
- [15] K. Roháček and M. Barták, "Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications," *Photosynthetica*, Vol. 37, No. 3, 1999, pp. 339-363. [doi:10.1023/A:1007172424619](https://doi.org/10.1023/A:1007172424619)
- [16] R. P. Sinha, M. Klisch, A. Vaishampayan and D.-P. Häder, "Biochemical and Spectroscopic Characterization of the Cyanobacterium *Lyngbya* sp. Inhabiting Mango (*Mangifera indica*) Trees: Presence of an Ultraviolet-Absorbing Pigment, Scytonemin," *Acta Protozoologica*, Vol. 38, No. 4, 1999, pp. 291-298.
- [17] G. Minotti and S. Aust, "The Requirement for Iron (III) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron (II) and Hydrogen Peroxide," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 262, No. 3, 1987, pp. 1098-1104.
- [18] C. Rusterucci, V. Stallaert, M. Milat, A. Pugin, P. Ricci and J. Blein, "Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*," *Plant Physiology*, Vol. 111, No. 3, 1996, pp. 885-891.
- [19] O. Borsani, P. Díaz and J. Monza, "Proline is Involved in Water Stress Responses of *Lotus corniculatus* Nitrogen Fixing and Nitrate Fed Plants," *Journal of Plant Physiology*, Vol. 155, No. 2, 1999, pp. 269-273. [doi:10.1016/S0176-1617\(99\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80018-2)
- [20] J. G. Foster and J. L. Hess, "Responses of Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Activities in Cotton Leaf Tissue Exposed to an Atmosphere Enriched in Oxygen<sub>1</sub>," *Plant Physiology*, Vol. 66, No. 3, 1980, pp. 482-487. [doi:10.1104/pp.66.3.482](https://doi.org/10.1104/pp.66.3.482)
- [21] R. F. Beer and I. W. Sizer, "A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 195, 1952, pp. 133-140.
- [22] G.-X. Chen and K. Asada, "Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties," *Plant Cell Physiology*, Vol. 30, No. 7, 1989, pp. 987-998.
- [23] O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, 1951, pp. 265-275.
- [24] J. L. Donahue, C. M. Okpodu, C. L. Cramer, E. A. Grabau and R. G. Alscher, "Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves (Relationships to Resistance)," *Plant Physiology*, Vol. 113, No. 1, 1997, pp. 249-257.
- [25] M. Sainz, P. Díaz, J. Monza and O. Borsani, "Heat Stress Results in Loss of Chloroplast Cu/Zn Superoxide Dismutase and Increased Damage to Photosystem II in Combined Drought-Heat Stressed *Lotus japonicus*," *Physiologia Plantarum*, Vol. 140, No. 1, 2010, pp. 46-56. [doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01383.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01383.x)
- [26] R. P. Sinha, M. Klisch, A. Gröniger and D.-P. Häder, "Ultraviolet Absorbing/Screening Substances in Cyanobacteria, Phytoplankton and Macroalgae," *Journal of Photochemistry & Photobiology. B: Biology*, Vol. 47, No. 2-3, 1998, pp. 83-94. [doi:10.1016/S1011-1344\(98\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00198-5)
- [27] Y. Y. He and D.-P. Häder, "UV-B Induced Formation of Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage of the Ascorbic Acid and N-Acetyl-L-Cysteine," *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 1, No. 10, 2002, pp. 729-736. [doi:10.1039/b110365m](https://doi.org/10.1039/b110365m)
- [28] P. S. Singh, R. P. Sinha, M. Klisch and D.-P. Häder, "Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) Profile of a Rice-Weld Cyanobacterium *Anabaena doliolum* as Influenced by PAR and UVR," *Planta*, Vol. 229, No. 1, 2008, pp. 225-233. [doi:10.1007/s00425-008-0822-1](https://doi.org/10.1007/s00425-008-0822-1)
- [29] M. P. Lesser, "Effects of Ultraviolet Radiation on Productivity and Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium, *Anabaena* sp. (Newton's Strain)," *Hydrobiologia*, Vol. 598, No. 1, 2008, pp. 1-9. [doi:10.1007/s10750-007-9126-x](https://doi.org/10.1007/s10750-007-9126-x)
- [30] D. Campbell, V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustaffson and G. Öquist, "Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation," *Microbiology & Molecular Biology Review*, Vol. 62, No. 3, 1998, pp. 667-683.
- [31] M. Lesser, "Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology," *Annual Review of Physiology*, Vol. 68, 2006, pp. 253-278. [doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001)
- [32] M. Lesser, J. Neale and J. J. Cullen, "Acclimation of Antarctic Phytoplankton to Ultraviolet Radiation: Ultraviolet-Absorbing Compounds and Carbon Fixation," *Molecular Marine Biology Technology*, Vol. 5, No. 4, 1996, pp. 314-332.
- [33] C. Hazzard, M. P. Lesser and R. A. Kinzie III, "Effects of Ultraviolet Radiation on Photosynthesis in the Subtropical Marine Diatom, *Chaetoceros gracilis* (Baccilariophyceae)," *Journal of Phycology*, Vol. 33, No. 6, 1997, pp. 960-968. [doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00960.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00960.x)
- [34] J. N. Bouchard, D. A. Roy and D. A. Campbell, "UVB Effects on the Photosystem II-D1 Protein of Phytoplankton and Natural Phytoplankton Communities," *Photochemistry & Photobiology*, Vol. 82, No. 4, 2006, pp. 936-

951. doi:10.1562/2005-08-31-IR-666
- [35] J. W. Newton, D. D. Tyler and M. E. Slodki, "Effects of Ultraviolet-B (290-320 nm) Radiation on Blue-Green Algae (cyanobacteria), Possible Biological Indicators of Stratospheric Ozone Depletion," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 37, No. 6, 1979, pp. 1137-1141.
- [36] W. D. P. Stewart, "Some Aspects of Structure and Function in N Fixing Cyanobacteria," *Annual Review of Microbiology*, Vol. 34, 1980, pp. 497-536. doi:10.1146/annurev.mi.34.100180.002433
- [37] A. Kumar, M. Tyagi, P. B. Jha, G. Srinivas and A. Singh, "Inactivation of Cyanobacterial Nitrogenase after Exposure to Ultraviolet-B Radiation," *Current Microbiology*, Vol. 46, No. 5, 2003, pp. 380-384. doi:10.1007/s00284-001-3894-8
- [38] M. Ehling-Schulz and S. Scherer, "UV Protection in Cyanobacteria," *European Journal of Phycology*, Vol. 34, No. 4, 1999, pp. 329-338. doi:10.1080/09670269910001736392
- [39] S. Scherer, H. Riege and P. Böger, "Light-Induced Proton Release by the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*: Dependence on Carbon Dioxide and Sodium," *Plant Physiology*, Vol. 86, No. 3, 1988, pp. 769-772. doi:10.1104/pp.86.3.769
- [40] D. R. Hill, S. L. Hladun, S. Scherer and M. Potts, "Water Stress Proteins of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) are Secreted with UV-A/B-absorbing Pigments and Associate with 1,4-b-D-Xylanxylanohydrolase Activity," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 10, 1994, pp. 7726-7734.
- [41] G. A. Böhm, W. Pfeleiderer, P. Böger and S. Scherer, "Structure of a Novel Oligosaccharide-Mycosporine-Amino Acid Ultraviolet A/B Sunscreen Pigment from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, 1995, pp. 8536-8539. doi:10.1074/jbc.270.15.8536
- [42] W. C. Dunlap and Y. Yamamoto, "Small-Molecule Antioxidants in Marine Organisms: Antioxidant Activity of Mycosporine-Glycine," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 112, No. 1, 1995, pp. 105-114. doi:10.1016/0305-0491(95)00086-N
- [43] R. W. Castenholz, "Multiple Strategies for UV Tolerance in Cyanobacteria," *Spectrum*, Vol. 10, 1997, pp. 10-16.
- [44] F. Garcia-Pichel and R. W. Castenholz, "Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 1, 1993, pp. 163-169.
- [45] J. G. Dillon, M. C. Tatsumi, P. G. Tandingan and R. W. Castenholz, "Effect of Environmental Factors on the Synthesis of Scytonemin, a UV Screening Pigment, in Cyanobacteria (*Chroococcidiopsis* sp.)," *Archives of Microbiology*, Vol. 177, No. 4, 2002, pp. 322-331. doi:10.1007/s00203-001-0395-x
- [46] M. Zeeshan and S. M. Prasad, "Differential Response of Growth, Photosynthesis, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation to UV-B Radiation in Three Cyanobacteria," *South African Journal of Botany*, Vol. 75, No. 3, 2009, pp. 466-474. doi:10.1016/j.sajb.2009.03.003
- [47] L. Szabados and A. Savouré, "Proline: A Multifunctional Amino Acid," *Trends in Plant Science*, Vol. 15, No. 2, 2009, pp. 89-97.
- [48] A. K. Singh, D. Chakravarty, T. P. K. Singh and H. N. Singh, "Evidence for a Role of L-Proline as a Salinity Protectant in the Cyanobacterium *Nostoc muscorum*," *Plant Cell Environment*, Vol. 19, No. 4, 1996, pp. 490-494. doi:10.1111/j.1365-3040.1996.tb00342.x
- [49] A. Chris, M. Zeeshan, G. Abraham and S. M. Prasad, "Proline Accumulation in *Cylindrospermum* sp.," *Environmental & Experimental Botany*, Vol. 57, No. 1-2, 2006, pp. 154-159. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.05.008
- [50] B. N. Tripathi and J. P. Gaur, "Relationship between Copper- and Zinc-Induced Oxidative Stress and Proline Accumulation in *Scenedesmus* sp.," *Planta*, Vol. 219, No. 3, 2004, pp. 397-404. doi:10.1007/s00425-004-1237-2
- [51] K. Asada, "Superoxide Dismutase," In: S. Otsuka and T. Yamanaka, Eds., *Metalloproteins*, Elsevier, Amsterdam, 1988, pp. 331-341.
- [52] C. Obinger, C. Günther, M. Regelsberger, A. Pircher, G. Strasser and G. Pescheck, "Scavenging of Superoxide and Hydrogen Peroxide in Blue-Green Algae (Cyanobacteria)," *Physiologia Plantarum*, Vol. 104, No. 4, 1998, pp. 693-698. doi:10.1034/j.1399-3054.1998.1040425.x
- [53] S. Mackerness, C. F. John, B. R. Jordan and B. Thomas, "Early Signaling Components in Ultraviolet-B Responses: Distinct Roles for Different Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide," *FEBS Letters*, Vol. 489, No. 2, 2001, pp. 237-242. doi:10.1016/S0014-5793(01)02103-2
- [54] P. Bhargava, N. Atri, A. K. Srivastava and L. C. Rai, "Cadmium Mitigates Ultraviolet-B Stress in *Anabaena doliolum*: Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants," *Biologia Plantarum*, Vol. 51, No. 3, 2007, pp. 546-550. doi:10.1007/s10535-007-0118-5
- [55] B. Shirkey, D. P. Kovarcik, D. J. Wright, G. Wilmoth, T. F. Prickett, R. F. Helm, E. M. Gregory and M. Potts, "Active Fe-Containing Superoxide Dismutase and Abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (Cyanobacteria) after Years of Desiccation," *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, No. 1, 2000, pp. 189-197. doi:10.1128/JB.182.1.189-197.2000
- [56] X. F. Zhang, F. X. Kong, H. S. Cao, J. K. Tan, Y. Tao and M. L. Wang, "Research on Recruitment Dynamics of Bloom-Forming Cyanobacteria in Meiliang Bay, Taihu Lake," *Chinese Journal of Applied Ecology*, Vol. 16, No. 7, 2005, 1346-1350.
- [57] J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé and F. Van Breusegem, "Dual Action of the Active Oxygen Species during Plant Stress Responses," *Cellular Molecular Life Sciences*, Vol. 57, No. 5, 2000, pp. 779-795. doi:10.1007/s000180050041
- [58] R. Araújo and D.-P. Häder, "Phycocerythrin Synthesis is Induced by Solar UV-B in the Cyanobacterium *Nostoc*," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 37, No. 3, 1999, pp. 223-229. doi:10.1016/S0981-9428(99)80037-0
- [59] P. Streb, A. Michael-Knauf and J. Feierabend, "Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II Are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions," *Physi-*

*ologia Plantarum*, Vol. 88, No. 4, 1993, pp. 590-598.  
[doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01376.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01376.x)

- [60] M. Wirstam, M. R. A. Blomberg and P. E. M. Siegbahn,  
“Reaction Mechanism of Compound I Formation in Heme

Peroxidases: A Density Functional Theory Study,” *Journal of American Chemistry Society*, Vol. 121, No. 43, 1999,  
pp. 10178-10185. [doi:10.1021/ja991997c](https://doi.org/10.1021/ja991997c)



---

# Nitrification and denitrification associated with N<sub>2</sub>O production in a temperate N- fertilized irrigated Uruguayan rice field

S. Tarlera<sup>\*1</sup>, S. Gonnet<sup>2</sup>, P. Irisarri<sup>2</sup>, J. Menes<sup>1</sup>, A. Fernández<sup>1</sup>, G. Paolino<sup>1</sup>, D. Travers<sup>1</sup> and E. Deambrosi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Facultad de Química and Facultad de Ciencias, Avda. Gral Flores 2124, CC 1157, Montevideo, URUGUAY

<sup>2</sup> Department of Plant Biology, Facultad de Agronomía, Avda. Garzón 780, Montevideo, URUGUAY

<sup>3</sup> INIA, Estación Experimental, Treinta y Tres, URUGUAY

## Abstract

**Keywords** : nitrification, rice, T-RFLP

Uruguay is the seventh largest rice exporting country in the world. Nitrogen is the single most limiting factor for rice production. Microbial soil processes, e.g. nitrification, denitrification and mineralization, influence the fate of the “mobile” N atom. There are gaps in the understanding of key processes that govern N cycling, availability and plant acquisition in irrigated rice systems. Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), a greenhouse gas, is produced as a by-product during nitrification and occurs as an intermediate during denitrification. The use of fertilizers with inhibitors of nitrification has been proposed as a mitigation strategy. This study showed that less than 7 % of the total N<sub>2</sub>O emission from ENTEC<sup>®</sup>-fertilized soils, containing an inhibitor of nitrification (DMPP: 3,4-dimethylpyrazole-phosphate) was due to nitrification. T-RFLP *amoA* analysis detected the presence of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* genera in urea-fertilized plots.

## 1 Introduction

Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O), a greenhouse gas, is produced as a by-product during nitrification and occurs as an intermediate during denitrification. Microbial processes in soils contribute about 70% of the atmospheric budget of N<sub>2</sub>O. N<sub>2</sub>O emissions from soils have greatly increased with increasing N inputs by fertilization of agricultural soils [1]. After the application of top dressings of ammonium fertilizers, aerobic nitrification is favoured producing nitrate which diffuses into the surrounding anoxic bulk soil where it is prone to denitrification. The use of nitrification inhibitors has been proposed as means of reducing N losses by denitrification and leaching.

Uruguay is the seventh largest rice exporting country in the world. Only one crop per year is grown during the southern hemisphere spring-summer season (October-March). The crop is broadcast seeded into dry soil and permanent flood is established 35-55 days after sowing. Nitrogen is the single most limiting factor for rice production. Several authors have found that N<sub>2</sub>O losses occur mainly after fertilization application during a period no longer than five weeks after application [2], coincident for rice in Uruguay with the period before flooding. After flooding, waterlogged conditions will probably induce N<sub>2</sub>O reduction to N<sub>2</sub> by denitrification. Highest nitrification activity in flooded rice soil fields has been reported to occur at the tillering rice stage and in the surface soil fraction (top 2-5 mm soil) [3].

The objective of this work was to evaluate the effect of a commercial fertilizer ENTEC<sup>®</sup>, containing an inhibitor of nitrification (DMPP: 3,4-dimethylpyrazole-phosphate) on nitrification-denitrification dynamics in a rice soil during a period of high risk for N<sub>2</sub>O emission and to examine the nature of the AOB communities inhabiting these soils.

---

\* \* Corresponding author: e-mail: starlera@fq.edu.uy, Phone: +5982 924 4209, Fax: +5982 924 1906

---

## 2 Materials and Methods

This work was conducted at the east of Uruguay (Treinta y Tres, Estación Experimental del INIA, Paso de la Laguna) during the 2004 growth season before flooding (October-December). This season was selected because soils are mainly aerobic and nitrification losses are maximal. A field experiment with *Oriza sativa* variety INIA Tacuarí broadcast seeded was laid out in a randomized complete block factorial design with three replicate plots (4 x 5 m each) of three treatments: control (no fertilizer), urea (18 KgN/ha at seeding, 23 KgN/ha at tillering and 23 kgN/ha at flowering), ENTEC<sup>®</sup>, BASF (60 KgN/ha at seeding): N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 18,5%, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 7,5% and DMPP (1 % content relative to N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content). Three sampling times were established: 10 and 42 days (tillering) after sowing and one week after flooding (day 52 after sowing).

Ten soil cores were collected from each plot and homogenized. All assays were performed in triplicate. Routine soil textural and chemical analysis were determined by standard procedures. Potential nitrification rates (PNR) were determined by the shaken soil-slurry method adding 1.5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> as described by Mintie et al. [4]. Denitrification enzyme assay (DEA) was determined following standard procedures [5] by measuring N<sub>2</sub>O formation in anaerobic slurries that received glucose (10 mM), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (1 mM) and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (10%, v/v). Nitrous oxide production was measured in sealed jars exposed to 0, 0.1 and 5% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> atmospheres in order to determine N<sub>2</sub>O total production, N<sub>2</sub>O coming from denitrification and total (N<sub>2</sub>O + N<sub>2</sub>) coming from denitrification as described by Merino et al. [6].

T-RFLP analysis (Terminal restriction fragment length polymorphism). DNA extraction from the samples was performed with Kit Mobio according to manufacture protocol. The DNA was amplified by PCR with specific primers for *amo* A genes and the primer amoA-1F were labeled with the dye 6-FAM (5-[6]-carboxy-fluorescein). The amplification product was purified and digested with *Taq*I. The restriction fragments were separated on an ABI 373 automated sequencer. The results were analyzed using GeneScan and Genotyper software (Applied Biosystems) [7]. Statistical differences were assessed using two-factor analysis of variance (ANOVA) for sampling time and fertilization, followed by Tukey's test for mean multiple comparisons.

## 3 Results and Discussion

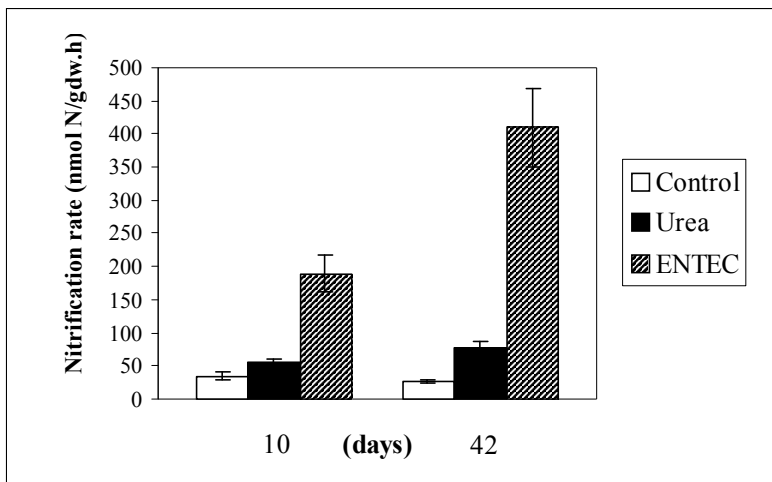
### 3.1 Physical and chemical characteristics of soils

Soil characteristics are: silty loam in texture, 3.0-3.5 % organic C and 5.0-5.5 % organic matter. Soil moisture content decreased from an average of 27 %, 10 days after seeding to an average of 2.3 % at tillering. No significant differences in initial N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> values (mean: 150 µg/gdw) between control, urea and ENTEC<sup>®</sup> fertilized soils were detected. A ten-fold decline in N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in all treatments was observed over the six-weeks sampling period resulting in a final mean value of 25 µg /gdw. Nitrate values also decreased with time from initial mean values of 33, 17 and 10 µgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gdw in ENTEC<sup>®</sup>, urea and control soils respectively, to below detection limit (<1 µgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gdw) after flooding in all treatments. Soil pH remained constant at 5.2. Average temperatures increased from 18.2 °C to 21.2 °C during the sampling period. 60.5 mm of rainfall accumulated from seeding up to day 10 and a further 23.9 mm up to day 42.

In the present investigation, mineral-N concentration decreased during the sampling period. This rapid decline in applied N- fertilizer in the inorganic fraction during the early growing season can be ascribed to rapid plant uptake, immobilization into the microbial biomass and loss of nitrogen through nitrification-denitrification reactions.

### 3.2 Nitrification and denitrification potentials

PNRs in fertilized and non-fertilized surface soils (Fig. 1), were calculated from the first 24 hours of incubation of the soil slurry experiments (linear rates of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  accumulation in soil slurry experiments). Tukey's comparison of the rate data indicated significant differences only for ENTEC<sup>®</sup> fertilization at both sampling times ( $\alpha= 0.05$ ). Highest activity was observed for the ENTEC<sup>®</sup> fertilization treatment at both sampling times. Initial nitrification rates of ENTEC<sup>®</sup> fertilized plots were 3.4 and 5.7 greater than urea and control treatments, respectively. Six weeks later, an order of magnitude increase over controls and a 5.3 times increase over urea was detected. ENTEC<sup>®</sup> fertilization clearly stimulated nitrifying activity after six weeks. PNR measured in this study, which ranged from ca 26 to 400 nmol N /gdw.h, were in the same range or even higher than rates found for other non-flooded agricultural soils [4] consistent with the drier soil conditions of this sampling period. In a recent study, Nicolaisen et al. [3] obtained PNR for urea-fertilized flooded rice surface soil averaging 54 nmol N/gdw.h. Nitrification studies in rice fields have mostly been conducted with permanently flooded rice soil systems, where anaerobic conditions prevail.

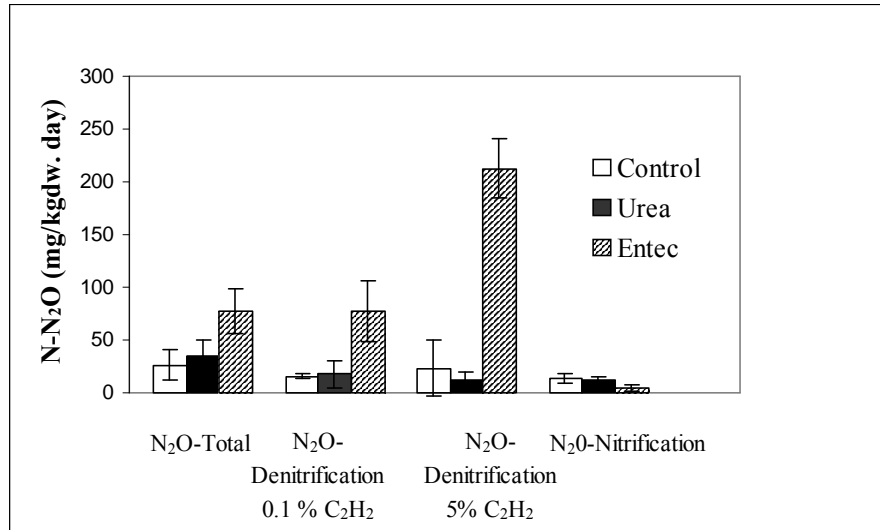


**Fig. 1** Potential nitrification rates in fertilized and control rice surface soil 10 and 42 days after sowing. Error bars represent  $\pm$  S. E.

DEA values obtained from control ( $113,6 \pm 4,3$  nmol N/gdw.h) urea ( $142,9 \pm 20,7$  nmol N/gdw.h) and ENTEC<sup>®</sup> ( $102,9 \pm 22,1$  nmol N/gdw.h) plots 6 weeks after sowing did not differ significantly. Furthermore, DEA measurements 10 days later (one week after flooding), indicated similar mean values in the plots with the different treatments (data not shown). However, nitrate values sharply declined in all treatments after flooding. Denitrifying communities were similarly active under denitrifying conditions compared to other rice submerged soils [2]. DEA and NPR values were similar in magnitude (Fig. 1), suggesting that denitrification can serve as a sink for nitrification.

### 3.3 Nitrous oxide production

To explore the effects of the nitrification inhibitor contained in ENTEC<sup>®</sup>,  $\text{N}_2\text{O}$  production was measured in fertilized (urea and ENTEC<sup>®</sup>) and control soils. ENTEC<sup>®</sup> has been reported to remain active for a period of 4-10 weeks [8]. DMPP is a nitrification inhibitor which blocks the first step of ammonia oxidation to nitrite in autotrophic ammonia oxidizers.

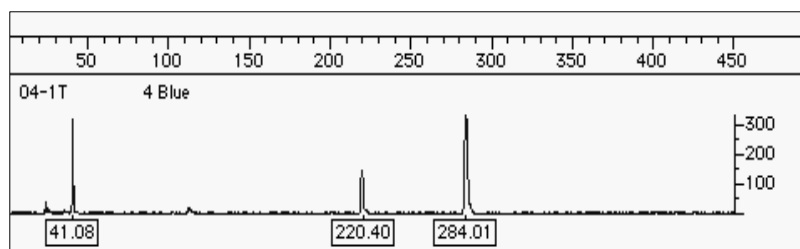


**Fig. 2** Nitrous oxide production from different processes 42 days after fertilization. Error bars represent  $\pm$  S. E

Results indicate that in control and urea-fertilized treatments, nitrification and denitrification processes were similarly active. A relatively minor contribution of nitrification to N<sub>2</sub>O production was observed in ENTEC<sup>®</sup>-fertilized soils. However, a higher N<sub>2</sub>O release from denitrification was observed in ENTEC<sup>®</sup> treatments not attributable to higher nitrate content at this sampling time (23 ENTEC<sup>®</sup> vs 21 urea  $\mu\text{gN-NO}_3^-/\text{gdw}$ ). In addition, an even contribution of N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> to total denitrification was detected. Heterotrophic nitrification cannot be dismissed since reports suggest that a higher concentration of acetylene (> 0.1%) is needed for complete inhibition ([9], Fig. 2). Further studies are needed to explore the importance of this process in this ecosystem.

#### 3.4 Diversity of ammonia-oxidizing bacteria

The diversity of the ammonia-oxidizing community in rice surface fertilized soil on day 42 was assessed by the cloning-independent procedure T-RFLP. Horz et al. [7] provided experimental evidence for the strict correlation between *amoA* based T-RFLP *TaqI*-fragments and phylogenetically defined subgroups of ammonia oxidizers. Amplification of *amoA* genes in samples from ENTEC<sup>®</sup> fertilized plots was not successful. T-RFLP analysis with *TaqI* profiles from triplicate urea treated soils consisted of either two fragments of 220 and 284-bp size or of the addition of a third fragment of 41 bp as shown in Fig. 2. According to available nucleotide sequence information, the 220 and the 284-bp fragments suggest the presence of *Nitrosomonas* species and of *Nitrosospira* species, respectively [7],[4]. *In silico* analysis of the *amoA* database could not indicate a possible assignment for the 41 bp fragment. To our knowledge, only isolates and sequences affiliated with *Nitrosomonas* species have been recovered from surface, bulk and rhizospheric soil [3], [10]. Both genus differ, among other traits, in affinity for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and growth rates.



**Fig. 3** T-RFLP profile from the digested (*Taq* I) *amoA* PCR product of an urea soil sample after 42 days. Fragment size of T-RFs are shown in base pairs (bp).

## 4 Conclusions

Less than 7 % of the total N<sub>2</sub>O emission from ENTEC<sup>®</sup>-fertilized soils was due to nitrification. On the other hand, higher potential nitrification rates compared to urea treatments could be indicative of the activity of heterotrophic ammonia oxidizers. T-RFLP *amoA* analysis detected the presence of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* genera in urea-fertilized plots.

**Acknowledgements** The support of CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) is gratefully acknowledged.

## References

- [1] U. Skiba and K. A. Smith, *Glob. Change Sci.*, **2**, 379 (2000)
- [2] L. Mei, L. Yang, D. Wang, B. Yin, J. Hu, and S. Yin, *Soil Biol. Biochem.*, **36**,1057 (2004).
- [3] M. H. Nicolaisen, N. Risgaard-Petersen, N.P. Revsbech, and W. Reichardt, *Microbiol. Ecol.*, **49**,359 (2004).
- [4] A. T. Mintie, R. S. Heichen, K. Cromack, Jr., D. Myrold and P. Bottomley, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3129 (2003).
- [5] J. M. Tiedje, *Methods of Soil Analysis, Part2- Microbiological and Biochemical Properties*, Madison, p.245 (1994).
- [6] P. Merino, J.M. Estavillo, G. Besca, M. Pinto and C. González-Murua, *Nutrient Cycling in Agrosystems*, **60**, 9 (2001).
- [7] H-P.Hortz, J-H. Rotthauwe, T. Lukow, and W. Liesack, *J. Microbiol. Methods*, **39**,197 (2000).
- [8] F. Azam, G. Benckiser, C Müller, and J. Ottow, *Biol. Fertil. Soils*, **34**, 118 (2001).
- [9] M. Daum, W. Zimmer, H. Papen, K. Kloos, K. Nawrath and H. Bothe, *Curr. Microbiol.*, **37**, 281 (1998).
- [10] A. Briones, S. Okabe, Y. Umehiya, N-B. Ramsing, W. Reichardt and H. Okuyama. *Plant and Soil*, **250**, 335 (2003).

## Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación

Domínguez, V.<sup>1\*</sup>(†); Irisarri, P.; y Gonnet, S.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía. Av. Garzón 780. Montevideo, Uruguay.

\*Este trabajo se publica en memoria de Valeria Domínguez (1976-2007) quien realizó los experimentos y estaba escribiendo los resultados para su Trabajo Especial II de la Licenciatura de Bioquímica.

Correo electrónico: irisarri@fagro.edu.uy

Recibido: 27/7/07 Aceptado: 26/12/07

### Resumen

El N<sub>2</sub>O, gas con efecto invernadero, se produce en procesos bacterianos como producto secundario del proceso de nitrificación y como intermediario en el proceso de desnitrificación. En el sistema de producción de arroz que se utiliza en Uruguay, la pérdida de nitrógeno en forma de N<sub>2</sub>O ha sido poco estudiada y para disminuirla se ha propuesto el uso de fertilizantes que contengan un inhibidor de la nitrificación. El objetivo de este trabajo fue medir si la inhibición de la nitrificación tiene efecto sobre las emisiones de N<sub>2</sub>O de un suelo cultivado con arroz y determinar si éstas provienen de la desnitrificación o de la nitrificación. El ensayo se realizó en invernáculo y se fertilizó con urea o ENTEC (fertilizante que contenía nitrato, amonio y el inhibidor de la nitrificación 3,4 dimetil pirezolofato). El efecto inhibidor de la nitrificación se evidenció en el tratamiento con ENTEC en una menor concentración de nitrato y menor cantidad de N<sub>2</sub>O emitido hasta los 30 días después de la siembra. Luego de 10 días de inundado el cultivo no se detectó emisión de N<sub>2</sub>O en ninguno de los tratamientos. El N<sub>2</sub>O proveniente de la nitrificación era menor en los tratamientos con ENTEC a los 14 días después de la siembra. Después de 35 días el N<sub>2</sub>O se originaba por desnitrificación en todos los tratamientos.

**Palabras clave:** desnitrificación, DMPP, N<sub>2</sub>O, nitrificación

### Summary

## Nitrous oxide emissions from soils planted with rice: effect of a nitrification inhibitor

Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is a greenhouse gas produced both by denitrification and nitrification processes and may constitute a significant nitrogen loss from agricultural soils. N<sub>2</sub>O losses in rice culture in Uruguay have been scarcely studied. The aim of this work was to measure the effect of a nitrification inhibitor on the N<sub>2</sub>O emissions from a rice field soil and to evaluate the contribution of nitrification and denitrification. The assay was placed in a greenhouse and consisted in urea and ENTEC (containing nitrate, ammonium and the nitrification inhibitor DMPP) fertilization. A closed-chamber technique was used for collecting gas samples at different dates, which were analysed for N<sub>2</sub>O by gas chromatography. Thirty days after fertilization soil nitrate content and N<sub>2</sub>O emission were lower for ENTEC treatment than for urea, confirming nitrification inhibitor effect. No emission was detected from 10 days after flooding for any treatment. N<sub>2</sub>O originated from nitrification was lower for ENTEC treatment 14 days after sowing. After 35 days N<sub>2</sub>O was due to denitrification in all treatments.

**Key words:** denitrification, DMPP, N<sub>2</sub>O, nitrification

## Introducción

El óxido nitroso ( $N_2O$ ) es un gas con efecto invernadero con un poder de calentamiento 297 veces superior al  $CO_2$  (IPCC, 2001). Se estima que el 70 % del  $N_2O$  emitido por la biosfera a la atmósfera proviene del suelo (Bouwman, 1996). La agricultura contribuye con un 65-80 % del  $N_2O$  antropogénico y la dinámica de su producción está determinada en gran medida por la fertilización nitrogenada.

La producción de  $N_2O$  ocurre básicamente en los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación. La nitrificación es un proceso aeróbico en el que el amonio es oxidado por bacterias hasta nitrato pasando previamente por nitrito. La desnitrificación es un proceso microbiano anaeróbico en el que el carbono orgánico es usado como fuente de energía y el nitrato es el aceptor de electrones que se reduce a  $NO$ ,  $N_2O$  y  $N_2$ .

En el cultivo de arroz el fertilizante nitrogenado aplicado se pierde además de por nitrificación-desnitrificación, por procesos fisicoquímicos como volatilización y lavado. En un ensayo realizado en la Estación Experimental de Paso de la Laguna- INIA Treinta y Tres con fertilizante enriquecido en  $^{15}N$  se estimaron pérdidas del 57 % cuando el N se aplicaba en una dosis a la siembra (Irisarri *et al.*, 2007). Cassman *et al.* (1998) citan estudios hechos en arrozales tropicales donde la mayoría de las pérdidas gaseosas provenían de la volatilización de amonio mientras que las de  $N_2O$  eran menores. Sin embargo, en las condiciones del cultivo en Uruguay, Tarlera *et al.*, (2006) sugieren que la nitrificación en el período previo a la inundación podría ser importante.

Müller *et al.* (2004) encontraron que las pérdidas de  $N_2O$  de los suelos ocurren principalmente después de la fertilización y durante un período de unos 10 días, lo que coincidiría en el cultivo de arroz con el período previo a la inundación si el fertilizante se aplica a la siembra. Después, las condiciones de anegamiento, probablemente inducirían la reducción del  $N_2O$  a  $N_2$  por desnitrificación (Granli y Bockman, 1994). La mayor actividad nitrificadora en suelos cultivados con arroz transplantado en el trópico, se ha encontrado al macollaje y en la fracción superficial del suelo (2-5 mm superiores) (Nicolaisen *et al.*, 2004).

Para aumentar la capacidad de retención de N se ha propuesto agregar al fertilizante un inhibidor de la nitrificación, compuesto que entelentece la oxidación de  $NH_4^+$  a  $NO_2^-$  en el suelo por un cierto período porque inhibe las actividades de las bacterias del género *Nitrosomonas*. Como el  $NO_2^-$  y el  $NO_3^-$  son compuestos claves en el proceso que lleva a la pérdida final de N

vía desnitrificación (en forma de  $N_2$  y  $N_2O$ ) y lixiviación, los inhibidores de la nitrificación pueden reducir los problemas ambientales y al mismo tiempo aumentar la eficiencia de la fertilización nitrogenada (Pasda *et al.*, 2001). Algunos de los denominados fertilizantes “de liberación lenta” tienen un inhibidor de la nitrificación incorporado en su formulación. Son presentados en forma granulada para ser fácilmente disueltos con la lluvia, dando lugar a un mosaico de concentraciones tanto del compuesto inhibidor como de  $NH_4^+$ . De este modo, se disminuyen las pérdidas por volatilización de  $NH_4^+$ , que ha sido reportado como el principal mecanismo de pérdida de fertilizante para el cultivo de arroz inundado (Freney *et al.*, 1990; Aulakh *et al.*, 1992).

El 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) es un inhibidor de la nitrificación que se ha encontrado disminuye las emisiones de  $N_2O$  (Linzmeier *et al.*, 2001) y que aumenta el rendimiento en cultivos de arroz entre otros (Pasda *et al.*, 2001).

En nuestro país, ensayos exploratorios de campo realizados en la zafra 2001-2002 en la Unidad Experimental Paso de la Laguna- INIA Treinta y Tres, empleando dos fuentes de N de liberación lenta comparadas con urea tuvieron resultados alentadores (Deambrosi y Méndez, 2002). Uno de los fertilizantes utilizados fue el ENTEC (marca registrada por BASF) que contiene DMPP. El % de N total absorbido por la planta debido al N aplicado fue mayor cuando se usó ENTEC al 75 % de la dosis recomendada comparado con el uso de urea.

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de un fertilizante con un inhibidor de la nitrificación (DMPP) sobre el rendimiento de arroz y las emisiones de  $N_2O$  del suelo, así como determinar la contribución relativa de la desnitrificación y de la nitrificación a la producción de  $N_2O$ .

## Materiales y métodos

El ensayo se realizó en invernáculo con arroz (*Oryza sativa* L.) variedad INIA Olimar que se sembró en macetas con suelo proveniente de la Estación experimental Paso de la Laguna del INIA Treinta y Tres. El suelo Solod melánico tenía las siguientes características: pH 5,2; M.O. 2,9; P Bray 7,2 ppm y K 0,28 meq/100g.

Se realizaron 3 tratamientos: 1) control sin fertilización, 2) tres dosis sucesivas de 20 kg N.ha<sup>-1</sup> de urea (a la siembra, macollaje y primordio floral), 3) dosis única de ENTEC de 60 kg N a la siembra. El inicio de macollaje (aplicación de la segunda dosis de urea) fue 28 días después de la siembra y el primordio floral (aplicación de la tercera dosis) fue 58 días después de la siembra.

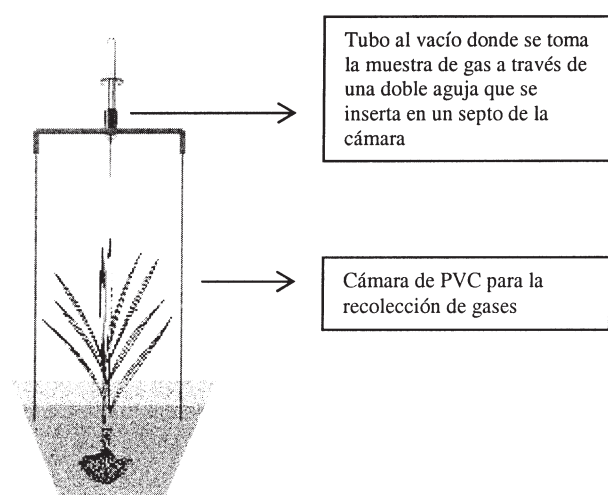
El fertilizante ENTEC26 contiene 26 % N (27 % nítrico y 73 % amoniacal), 32,5 %  $\text{SO}_3$  y dimetil pirazol fosfato (DMPP) como principio activo inhibidor de la nitrificación.

Las macetas se colocaron de a tres, en cajones de plástico que se inundaron 30 días después de la siembra (inicio del macollaje). Los cajones se colocaron al azar y se rotaron periódicamente para que todos los tratamientos recibieran la misma cantidad de luz. Se usaron seis repeticiones (macetas) por tratamiento.

### Determinación de $\text{N}_2\text{O}$ emitido por el suelo

El  $\text{N}_2\text{O}$  se midió en distintos momentos del ciclo de cultivo utilizando cámaras cerradas de 23 cm de alto, enterradas 3 cm en el suelo (Figura 1). El extremo superior, abierto al aire, se cerró en cada medición durante una hora con una tapa hermética y a intervalos regulares de 0, 30 y 60 minutos se tomaron muestras de la atmósfera bajo la campana en un tubo al vacío. Se determinó la concentración de  $\text{N}_2\text{O}$  con un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14B con detector de captura electrónica (columna de Porapak Q, temperaturas de columna, inyector y detector 70° C, 90° C y 300° C) provisto de válvulas de venteo para evitar la interferencia del  $\text{O}_2$  y del acetileno. La tasa de emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  se corrigió por la temperatura en el momento de muestreo y se calculó según Hutchinson y Mosier (1981).

El flujo de masa neto de  $\text{N}_2\text{O}$  durante un período determinado de tiempo se calculó como el flujo promedio entre 2 fechas de medición multiplicado por el número de días transcurridos (Bowden *et al.*, 1990).



**Figura 1.** Sistema empleado para la toma de muestras de gases para analizar el flujo de  $\text{N}_2\text{O}$ .

### Determinación del aporte de la desnitrificación y la nitrificación a las emisiones de $\text{N}_2\text{O}$

El primer paso en la nitrificación autotrófica es catalizado por la enzima amonio monooxigenasa que se inhibe por acetileno a presiones de 0,01-0,1 % (Klemetsson *et al.*, 1988). Por lo tanto, el  $\text{N}_2\text{O}$  producido por la incubación de suelo con acetileno a bajas presiones proviene de la desnitrificación. La tasa de producción por nitrificación puede estimarse como la diferencia entre el  $\text{N}_2\text{O}$  producido por incubación del suelo sin acetileno y con 0,1 % de acetileno. Para determinar si la desnitrificación continúa hasta  $\text{N}_2$  se incubó con 5 % de acetileno que inhibe la óxido nitroso reductasa (que cataliza el pasaje de  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ ). La determinación del  $\text{N}_2\text{O}$  proveniente de la nitrificación y de la desnitrificación se realizó, de acuerdo a estas consideraciones, según Merino *et al.* (2001).

Para esto se tomaron muestras de los 5 cm superficiales del suelo seco en tres momentos del cultivo de arroz (a los 14, 35 y 148 días de la siembra) que se humedecieron en forma homogénea hasta llevarlas a capacidad de campo. Las muestras se incubaron en frascos cerrados a 28° C con 0 %, 0.1 % y 5 % de acetileno durante 24 horas. Se tomaron muestras de los frascos y el óxido nitroso  $\text{N}_2\text{O}$  se midió por cromatografía gaseosa.

### Determinaciones analíticas

Para determinar la evolución del nitrógeno mineral en el suelo se tomaron muestras de los 5 cm superiores en los momentos en que se midieron las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ . La determinación de  $\text{NO}_3^-$  se realizó siguiendo el método de Cataldo *et al.* (1975) y el amonio se determinó según Mulvaney (1996).

El rendimiento de arroz se determinó como peso seco de grano a la cosecha y el nitrógeno total se analizó por el método de Kjeldahl según Faust *et al.* (1987).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el procedimiento GLM de Statistical Analysis System (SAS Institute, 2001). La mínima diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se determinó por el test de Tukey.

### Resultados y discusión

#### Efecto del inhibidor de la nitrificación sobre el rendimiento

En el cuadro 1 se presentan los rendimientos de los distintos tratamientos. Los rendimientos de los dos tra-



**Cuadro 1.** Rendimiento de grano de arroz obtenido con los distintos tratamientos de fertilización.

Tratamiento	Grano <sup>†</sup> (kg ha <sup>-1</sup> )
Control	3.800 ± 400 (c)
Urea	6.000 ± 1000 (a)
ENTEC	4.900 ± 500 (a,b)

<sup>†</sup>= corresponde a promedios de seis repeticiones con desvío estándar. Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

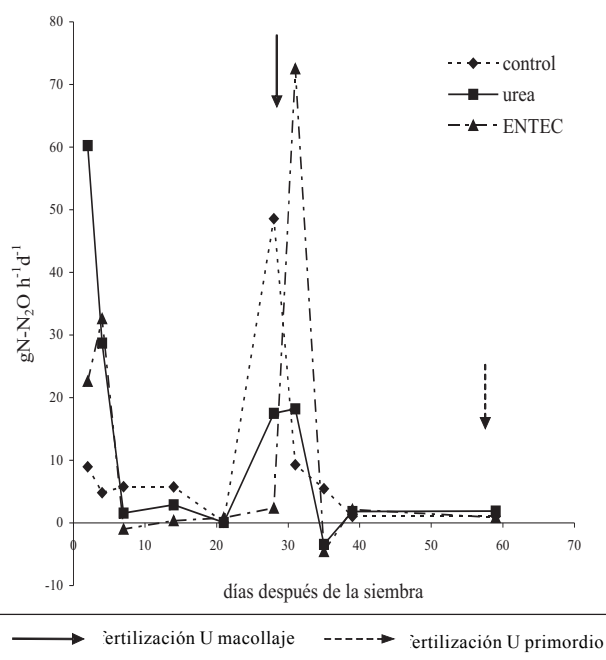
tamientos fertilizados son significativamente distintos al control pero el rendimiento del tratamiento con ENTEC aplicado a la siembra no es significativamente diferente al obtenido con urea fraccionada, si bien este último fue mayor.

La eficiencia de uso del fertilizante en arroz puede duplicarse con el fraccionamiento (Irisarri *et al.*, 2007). En este caso con la aplicación de una dosis única de ENTEC a la siembra el rendimiento de arroz no fue menor que el obtenido cuando se aplicó urea fraccionada. Como el fertilizante con inhibidor de la nitrificación es más caro que la urea, su empleo podría justificarse en caso de aplicarse con la siembra y, por lo tanto, disminuir el costo de las distintas aplicaciones que, en general, se realizan con avión (Deambrosi E., com pers).

### Emisiones de N<sub>2</sub>O por el suelo

Los resultados de las determinaciones de flujo de emisión de N<sub>2</sub>O se presentan en la figura 2. Las diferencias no son significativas entre los tratamientos, pero hasta los 30 días la tendencia es a menores emisiones en el tratamiento con ENTEC respecto al fertilizado con urea. Debe considerarse además la diferencia de nitrógeno aportado a la siembra en cada tratamiento, 20 kg de N en el tratamiento de urea y 60 kg como ENTEC. La alta variabilidad en la medición de las emisiones, que ha sido comunicada por varios autores (Petersen, 1999; Flessa *et al.*, 1998), no permitió detectar diferencias entre los tratamientos aunque, contrariamente a lo esperado, el pico máximo de N<sub>2</sub>O fue detectado en el tratamiento con ENTEC 35 días después de la siembra, con el cultivo ya inundado (Figura 2).

El agregado de urea a la siembra aumentó el contenido de amonio desde el día 4 (Cuadro 2) indicando ocurrencia de hidrólisis de la urea y posterior disminución rápida del amonio al tiempo que aumentaba la concentración de nitrato (nitrificación). Los valores de N



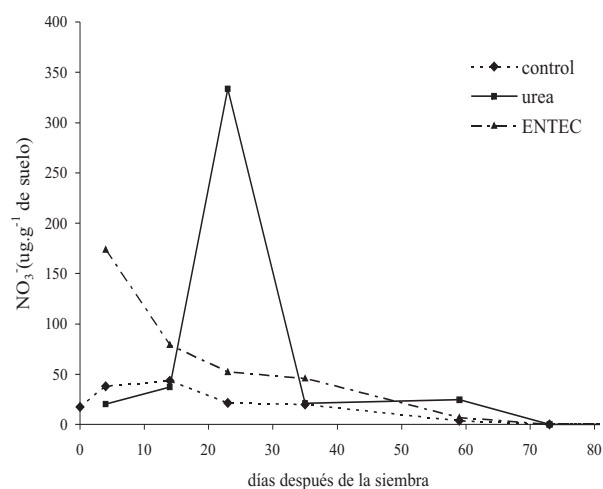
**Figura 2.** Evolución del flujo de N<sub>2</sub>O hasta los 60 días de sembrado el arroz para los distintos tratamientos de fertilización.

mineral en el suelo control son difíciles de explicar, pero debe considerarse que las muestras analizadas fueron tomadas de los 5 cm superiores por lo que pueden no representar adecuadamente lo que ocurre en el perfil del suelo.

Aproximadamente desde 10 días después de establecida la inundación, coincidiendo con la disminución de nitrato en el suelo (Figura 3) y el aumento de la concentración de amonio (Cuadro 2), las emisiones son muy bajas en todos los tratamientos (Figura 2).

**Cuadro 2.** Contenido de amonio en el suelo durante los primeros 60 días del cultivo de arroz bajo diferentes tratamientos de fertilización.

Días	Amonio (μg g <sup>-1</sup> )		
	Control	Urea	ENTEC
0	7	7	7
4	115	154	338
14	11	34	127
23	6	8	45
59	63	37	69

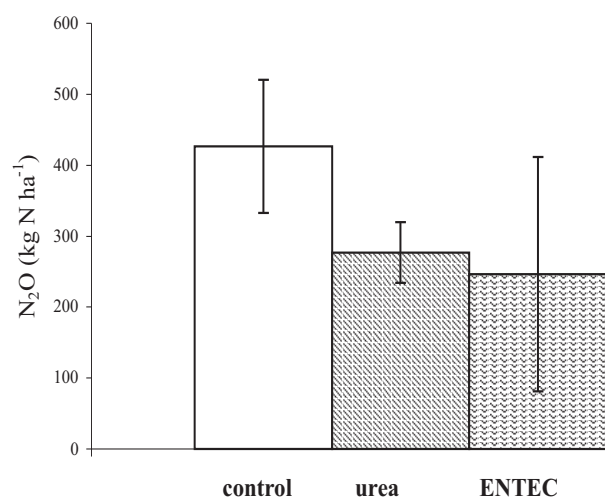


**Figura 3.** Evolución del contenido de nitrato en el suelo durante el ciclo de cultivo.

A los 14 días la cantidad de nitrato en el suelo (Figura 3) no es estadísticamente diferente entre tratamientos, pero a los 23 días el tratamiento con ENTEC evidencia una menor concentración de nitrato que el de urea, a consecuencia de la presencia del inhibidor de la nitrificación. La concentración de nitrato es menor en ese tratamiento hasta los 30 días luego de la siembra. A los 4 días el nitrato en el tratamiento con ENTEC es mayor debido a que contiene nitrato en su composición.

No se encontró correlación entre el nitrato del suelo (Figura 3) y el flujo de N<sub>2</sub>O (Figura 2). La emisión de N<sub>2</sub>O depende del nitrato presente en el suelo pero es influenciada por múltiples factores y una correlación simple no explica adecuadamente todos los procesos involucrados (Lark *et al.*, 2004). Otra posible explicación para la falta de correlación entre nitrato y flujo de N<sub>2</sub>O es que el suelo emite también nitrógeno bajo forma de N<sub>2</sub> y de NO.

En la figura 4 se muestran los flujos acumulados de N<sub>2</sub>O durante los primeros 35 días del cultivo lo que coincide con los mayores flujos de este gas. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos por lo que la aplicación de urea fraccionada (hasta esa fecha se habían realizado 2 fertilizaciones) y el ENTEC (con inhibidor de la nitrificación) no aumentaron las emisiones respecto al control sin fertilizar. El fraccionamiento de la urea sería adecuado a los requerimientos del cultivo y, por lo tanto, el nitrógeno mineral del suelo no estaría en exceso como para sufrir procesos de nitrificación o desnitrificación que originan las pérdidas de N<sub>2</sub>O. La dosis de N aplicada como ENTEC



**Figura 4.** Flujo neto de N<sub>2</sub>O acumulado durante los 35 días iniciales del cultivo.

Las barras representan los desvíos estándar. No hay diferencias significativas entre tratamientos.

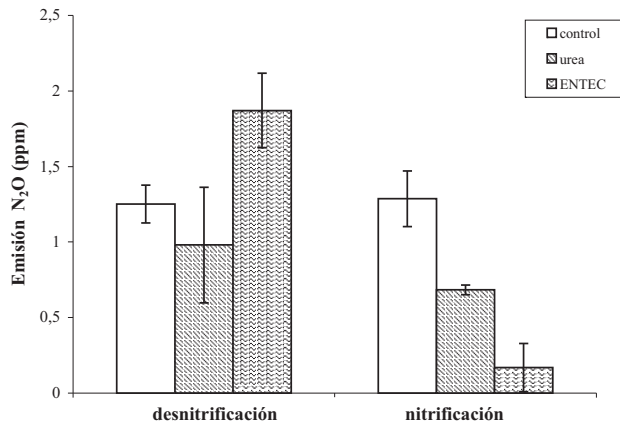
(60 kg) era mayor hasta ese momento que la de urea (40 kg) y, por lo tanto, el tratamiento con ENTEC presentó menores emisiones de N<sub>2</sub>O que el de urea por unidad de N aplicada, sin considerar el control que tuvo un rendimiento menor de arroz.

Cabe señalar sin embargo, que en los tratamientos control y ENTEC la mayor parte de las emisiones de N<sub>2</sub>O corresponden a un único pico de emisión (Figura 2).

#### Aporte de la desnitrificación y la nitrificación a las emisiones de N<sub>2</sub>O

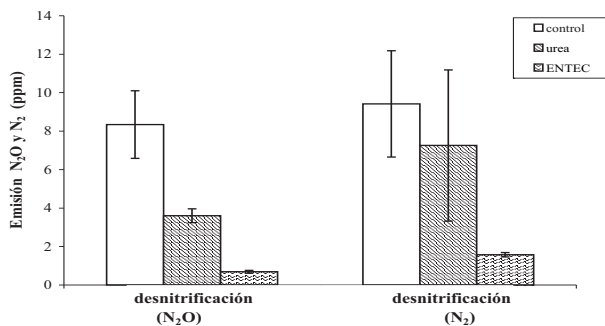
Los ensayos de laboratorio para determinar si el N<sub>2</sub>O provenía de la nitrificación o de la desnitrificación evidenciaron diferencias (p=0.01) entre algunos tratamientos a los 14 y a los 35 días después de la siembra (Figuras 5 y 6).

A 14 días de la siembra se registró emisión de N<sub>2</sub>O tanto por nitrificación como por desnitrificación en todos los tratamientos y no hubo diferencias en el N<sub>2</sub>O total emitido (Figura 5). La desnitrificación ocurrió solamente hasta óxido nitroso ya que cuando se inhibió la enzima que cataliza el pasaje a N<sub>2</sub>, no se detectó mayor producción de N<sub>2</sub>O. En el tratamiento con fertilizante con inhibidor de la nitrificación (ENTEC) la nitrificación fue menor que la desnitrificación, mientras que al N<sub>2</sub>O emitido por el control y el tratamiento fertilizado con urea contribuyeron igualmente nitrificación y desnitrificación. Como este ensayo se realizó en el laboratorio a capacidad de campo se esta-



**Figura 5.** Producción de N<sub>2</sub>O del suelo por desnitrificación y nitrificación a los 14 días de la siembra.

Las barras representan los desvíos estándar.



**Figura 6.** Producción de N<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub> del suelo por desnitrificación a los 35 días de la siembra.

Las barras representan los desvíos estándar.

ría midiendo desnitrificación que puede no ocurrir en las condiciones redox del campo en esa etapa del cultivo. Emisiones similares de N<sub>2</sub>O para los tratamientos control y urea pueden explicarse por iguales concentraciones de nitrato en el suelo en ese momento. Estudios en arrozales tropicales (Ghosh *et al.*, 2003) demostraron por el contrario que la fertilización con urea aumenta la población de microorganismos nitrificantes. Nicolaisen *et al.* (2004) señalan que las pérdidas por nitrificación- desnitrificación acopladas son menos del 10 % del N tomado por la planta y que una posible pérdida significativa de N debida a esos procesos solo puede esperarse cuando el sistema radicular no está desarrollado y la planta no compete adecuadamente por el nitrato del suelo.

La menor contribución de la nitrificación al N<sub>2</sub>O emitido a los 14 días en el tratamiento con ENTEC (Figura 5), comprobó el efecto de bloqueo del primer paso de la oxidación de amonio a nitrito en las bacterias autótrofas oxidadoras de amonio. No hay que descartar, sin embargo, que una parte de lo que se consideró emisiones provenientes de la desnitrificación, se originen por nitrificación heterotrófica que, para inhibirse completamente, necesita concentraciones de acetileno mayores a 0.1 % (Daum *et al.*, 1998). En las condiciones de invernáculo no se permitió que el suelo se secase mediante riegos en la etapa previa a la inundación, por lo que podría estarse subestimando la nitrificación que ocurriría en el campo en suelo seco.

A los 35 días en cambio, con el cultivo ya inundado y en activo macollaje, no se detectó nitrificación en ningún tratamiento y en todos los casos la desnitrificación prosiguió en parte hasta N<sub>2</sub> (Figura 6). La menor desnitrificación correspondió al tratamiento con ENTEC y los otros 2 tratamientos emitieron más N<sub>2</sub>O por desnitrificación que a los 14 días de la siembra.

Hay evidencias de que cantidades importantes de fertilizante se pierden vía desnitrificación en suelos subtropicales semiáridos bajo inundación (Aulakh *et al.*, 1992). A diferencia de lo que ocurre en nuestro caso, en esos suelos el bajo contenido en C orgánico afecta la desnitrificación aún en presencia de nitrato.

A la cosecha (148 días) todo el óxido nitroso proviene de la desnitrificación, ya que el valor de N<sub>2</sub>O medido al inhibir la nitrificación era igual al total (sin inhibir) y no se observaron diferencias entre tratamientos, con una media de 1,1 ppm de N<sub>2</sub>O emitido (datos no mostrados). La desnitrificación no proseguía hasta N<sub>2</sub> probablemente debido a que previo a la cosecha se dejó de regar. Wrage *et al.*, (2004) comunicaron que en condiciones de saturación no se logra efectividad en la inhibición de la N<sub>2</sub>O reductasa con 5 % de acetileno por problemas de difusión, así que estos resultados pueden haber subestimado las emisiones como N<sub>2</sub>. Estos ensayos de nitrificación- desnitrificación con inhibición por acetileno nos dan una fotografía instantánea y problemas metodológicos con la inhibición a distintas concentraciones de acetileno deben relativizar la interpretación de los procesos productores de N<sub>2</sub>O.

Las muestras se tomaron de los 5 cm superficiales del suelo asumiendo que después de la aplicación del fertilizante los flujos de N<sub>2</sub>O derivan de procesos microbianos en la capa superficial del suelo donde permanece la mayor parte del N mineral aplicado. Esto pudo no reflejar adecuadamente todos los procesos que estaban ocurriendo ya que se ha comunicado una alta

tasa de nitrificación a profundidades entre 5 y 25 cm en suelos secos (Müller *et al.*, 2004).

Aunque las emisiones de N<sub>2</sub>O de cultivos de arroz inundado no se consideran muy importantes, ya que el N<sub>2</sub>O se reduciría rápidamente a N<sub>2</sub> en condiciones anaeróbicas, debe tenerse en cuenta que los primeros centímetros de suelo y la zona alrededor de las raíces son parcialmente aeróbicas aún bajo inundación.

### Conclusiones

En este trabajo, bajo las condiciones controladas del invernáculo, no se observaron flujos mayores de N<sub>2</sub>O después de más de una semana de instalada la inundación. El fertilizante con el inhibidor de la nitrificación DMPP produjo menor concentración de nitrato en el suelo y una menor emisión de N<sub>2</sub>O hasta los 30 días después de la siembra. Sin embargo, las emisiones de N<sub>2</sub>O acumuladas no fueron afectadas por los tratamientos. A los 35 días de cultivo y a la cosecha todo el N<sub>2</sub>O provenía de la desnitrificación en todos los tratamientos mientras que tanto nitrificación como desnitrificación fueron fuentes de N<sub>2</sub>O cuando el cultivo no estaba anegado.

Los resultados indicarían que las emisiones de N<sub>2</sub>O en el cultivo de arroz en estas condiciones estarían dirigidas principalmente por procesos reductivos en el suelo aunque se necesitan estudios más exhaustivos para explorar la importancia de los procesos de nitrificación-desnitrificación en este ecosistema.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica – Sector Productivo (UdelaR). Agradecemos a W. Ibáñez por el asesoramiento en el análisis estadístico.

### Bibliografía

- Aulakh, M. S.; Doran, J. W. and Mosier, R.** 1992. Soil denitrification- Significance, measurements, and effects of management. *Adv. Soil Sci.* 18:1-57.
- Bouwman, A. F.** 1996. Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 46:53-70.
- Bowden, R. D.; Melillo, J. M.; Steudler, P. A. and Aber, J. D.** 1990. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the northeastern United States. *J. Geophys. Res.* 95:13997-14005.
- Cataldo, D.; Haroon, M.; Scharader, L. and Youngs, V.** 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Com. Soil Sci. Plant Annal.* 6:71-80.
- Cassman, K. G.; Peng, S.; Olk, D. C.; Ladha, J. K.; Reichardt, W.; Dobermann, A. and Singh, U.** 1998. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved resource management in irrigated rice systems. *Field Crops Res.* 56:7-39.
- Daum, M.; Zimmer, W.; Papen, H.; Kloos, K.; Nawrath, K. and Bothe, H.** 1998. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Curr. Microbiol.* 37: 281-288.
- Deambrosi, E. y Méndez, R.** 2002. Evaluación de Fuentes de nitrógeno de liberación lenta. Capítulo 3 – Manejo de Suelos – Nutrición. INIA Treinta y Tres. ARROZ – Resultados Experimentales 2001 – 2002. pp. 5 – 7.
- Faust, H.; Sebastianelli, J.A. and Axmann, H.** 1987. Manual de laboratorio, métodos para el análisis de <sup>15</sup>N. FAO/OIEA. Viena.
- Flessa, H.; Wild, U.; Klemisch, M. and Pfadenhauer, J.** 1998. Nitrous oxide and methane fluxes from organic soils under agriculture. *Eur. J. Soil Sci.* 49:327-335.
- Freny, J. R.; Trevitt, A. C. F.; De Datta, S. K.; Obcemea, W. N. and Real, J. G.** 1990. The interdependence of ammonia volatilization and denitrification as nitrogen loss processes in flooded rice fields in the Philippines. *Biol. Fertil. Soils* 9:31-36.
- Ghosh, P. and Kashyap, A. K.** 2003. Effect of rice cultivars on rate of N-mineralization, nitrification and nitrifier population size in an irrigated rice ecosystem. *Appl. Soil Ecol.* 24:27-41.
- Granli, T. and Bockman, O. C.** 1994. Nitrous oxide from agriculture. *Nor. J. Agric. Sci. (Suppl. 12)* Agricultural University of Norway, Advisory Service, As, Norway.
- Hutchinson, G. and Mossier, A.** 1981. Nitrous oxide emissions from cropped fields. *J. Environ. Qual.* 10:169-173.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).** 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Houghton, J.T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C.A. Johnson (eds). Cambridge University Press, Cambridge (UK), 881pp.
- Irisarri, P.; Gonnet, S.; Deambrosi, E. and Monza, J.** 2007. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:237-242.
- Klemetsson, L.; Svensson, B. and Rosswall, T.** 1988. A method of selective inhibition to distinguish between nitrification and denitrification as sources of nitrous oxide in soil. *Biol. Fertil. Soils* 6:112-119.
- Kumar, U.; Jain, M. C.; Pathak, H.; Kumar, S. and Majumdar, D.** 2000. Nitrous oxide emission from different fertilizers and its mitigation by nitrification inhibitors in irrigated rice. *Biol. Fertil. Soils* 32: 474-478.

- Lark, R.M.; Milne, A.E; Addiscott, T.M.; Goulding, K.W.T.; Webster, C.P. and O'Flaherty, S.** 2004. Scale and location dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: an analysis using wavelets. *Eu. J. Soil Sci.* 55:611-627.
- Linzmeier, W.; Gutser, R. and Schmidhalter, U.** 2001. Nitrous oxide emissions from soil and from a nitrogen-15-labelled fertilizer with the new nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). *Biol. Fertil. Soils* 34:103-108.
- Merino, P.; Estavillo, J. M.; Besga, G.; Pinto, M. and González-Murua, C.** 2001. Nitrification and denitrification derived  $N_2O$  production from a grassland soil under application of DCD and Actilith F2. *Nutr.Cicl.Agrocosystem* 60:9-14.
- Müller, C.; Stevens, R. J.; Laughlin, R. J. and Jäger, H. J.** 2004. Microbial processes and the site of  $N_2O$  production in a temperate grassland soil. *Soil Biol Biochem.* 36:453-461.
- Mulvaney, R. L.** 1996. Nitrogen - inorganic forms. En: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods.* D.L. Sparks *et al.* (Eds.) ASA and SSSA, Madison WI. p 1123-1184.
- Nicolaisen, M.H.; Risgaard-Petersen, N.; Revsbech, N. P.; Reichardt, W. and Ramsing, N. B.** 2004. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49:359-369.
- Pasda, G.; Händel, R. and Zerulla, W.** 2001. Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol. Fertil. Soils* 34:85-97.
- Petersen, S. O.** 1999. Nitrous oxide emissions from manure and inorganic fertilizers applied to spring barley. *J. Environ. Qual.* 28: 1610-1618.
- SAS Institute.** 2001. SAS system for Windows. Release 8.02. SAS Inst., Cary, NC.
- Tarlera, S.; Gonnet, S.; Irisarri, P.; Menes, J.; Fernández, A.; Paolino, G.; Travers, D. y Deambrosi, E.** 2005. Nitrification and denitrification associated with  $N_2O$  production in a temperate N-fertilized irrigated Uruguayan ricefield. En: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology.* Ed. A. Méndez Vilas Wiley-VHC, eds. Weinheim pp.416-420.
- Wrage, N.; Velthof, G. L.; Laanbroek, H. J. and Oenema, O.** 2004. Nitrous oxide production in grassland soils: assessing the contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biol. Biochem.* 36: 229-236.

# Nitrous oxide emissions from an Uruguayan *argiudoll* under different tillage and rotation treatments

Carlos Perdomo · Pilar Irisarri · Oswaldo Ernst

Received: 4 August 2008 / Accepted: 18 November 2008  
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

**Abstract** Lack of local data limits estimation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from different land uses of Uruguay. As a first step towards obtaining local information, we measured from August 2003 to September 2004 N<sub>2</sub>O fluxes from a rotation-by-tillage experiment established in 1993 and from a nearby natural pasture (NP). Nitrous oxide emission rates were measured on an event-driven basis by using the closed chamber technique with six replicates per treatment. Fluxes varied considerably with time and the higher rates (more than 30 g N ha<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) were generally associated with periods of high soil water content, high temperature, and/or decreasing soil nitrate. We could not identify, however, any statistically significant correlation between flux and these variables. Throughout the evaluation period, fluxes from crops or cultivated pastures tended to be higher than those from NP, but the effects of tillage (no-till and conventional tillage) or rotation (continuous tillage and rotation with pasture) were not consistent. The application of 112 kg N ha<sup>-1</sup> to barley did not increase N<sub>2</sub>O fluxes probably due to a high fertilizer use efficiency caused by the recommended three-split application and by the lack of rain during this period. The annual cumulative flows of different treatments compared well with those estimated using IPCC

methodology, but the high spatial and temporal variability observed in this one-year study indicate that further research is needed to obtain reliable data on N<sub>2</sub>O fluxes from agricultural soils of Uruguay.

**Keywords** No-till · Moldboard plow · Chisel plow · Rotation with pastures · IPCC methodology · Uruguay

## Introduction

The concentration of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) in the atmosphere has been increasing during the last few decades at an accelerated rate. Its contribution to increased atmospheric radiative forcing and its influence on decreasing atmospheric ozone levels have raised interest in evaluating its sources and sinks. Natural and agricultural soils are considered the most important sources of N<sub>2</sub>O, with estimated global emissions of 6.0 and 4.2 Tg N<sub>2</sub>O–N year<sup>-1</sup>, respectively (Intergovernmental Panel on Climate Change 2001). In Uruguay (56° S lat., 50 m elevation), the agricultural sector has been identified as responsible for 99% of the N<sub>2</sub>O emissions (Uruguay Ministry of Environment Climate Change Unit 2002). These estimations are based on mean Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) factors, but because of the lack of local data, there is high uncertainty on

C. Perdomo (✉) · P. Irisarri · O. Ernst  
Universidad de la República, Facultad de Agronomía,  
Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay  
e-mail: chperdom@fagro.edu.uy; chperdomo@gmail.com



the actual N<sub>2</sub>O fluxes from the prevalent land use types.

The current IPCC methodology (IPCC 2006) for producing national inventories of N<sub>2</sub>O from agricultural land assumes a default emission factor of 1.00% of all the nitrogen added to the soil. This emission factor is based on a study by Bouwman (1996) and corrected lately (IPCC 2006). This IPCC methodology, however, does not account for climate, management practice, irrigation, soils, crop types and other variables that have been found to influence N<sub>2</sub>O emissions (Conen et al. 2000). Moreover Boeckx and Van Cleemput (2001) suggested that this IPCC factor could differ substantially from field observations. Default factors used in the IPCC methodology to multiply for activity data could result in a large overestimation of the N<sub>2</sub>O inventory but there are also reports indicating underestimation of N<sub>2</sub>O emissions (Parkin and Kaspar 2006).

In Uruguay, most of the land was traditionally under permanent natural grass vegetation, and used for cattle-raising. The rest of the area was cultivated with crops and pastures, generally in a variable rotation sequence. Since the last 10 years, however, the area destined to agriculture has increased, promoted by the increase in the price of commodities. Furthermore, agriculture is progressively carried out in a continuous way, without rotation with cultivated pastures, by the use of No-till (NT) farming technology in more than 50% of the agricultural area (García-Préchac et al. 2004).

This land-use change could influence the magnitude of N<sub>2</sub>O emissions, but the direction of these changes could not always be predicted. It is known that crop types exert a large effect on N<sub>2</sub>O emissions; with emissions from grassland and non-cereal crops being consistently higher than those from cereals (Smit 1999). The effect of tillage on N<sub>2</sub>O fluxes, on the other hand, seems to be more variable, depending probably on other environmental conditions (Parkin and Kaspar 2006). Thereby, there have been conflicting reports on the effect of tillage, with some authors reporting much higher N<sub>2</sub>O fluxes under NT (Ball et al. 1999; Passianoto et al. 2003), while others finding only very small increases or no differences with respect to conventional tillage (Robertson et al. 2000).

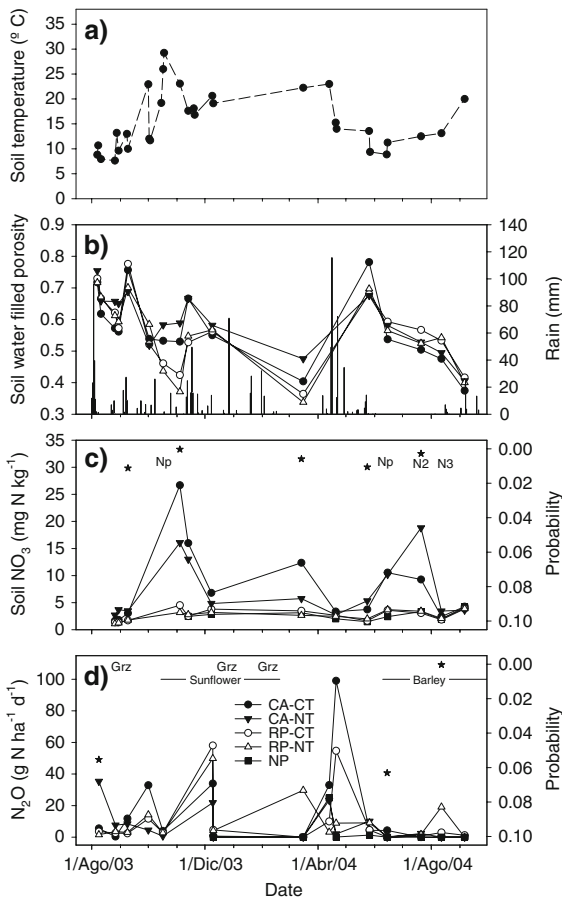
The objective of this work was to compare the magnitude of N<sub>2</sub>O emissions from agricultural crops

and cultivated pastures with those of natural pastures, still the prevalent land use type of Uruguay. In addition, we evaluated N<sub>2</sub>O emissions from agricultural crops under continuous agriculture or in rotation with pastures, and the effect of NT on emissions from both agricultural crops and cultivated pastures. This information, which is the first field-collected data on N<sub>2</sub>O emissions from soils in this country, could be used to improve the accuracy of Uruguayan reports on N<sub>2</sub>O emissions, and to better forecast the effects of future land-use-change scenarios on N<sub>2</sub>O emissions.

## Materials and methods

Nitrous oxide emission rates were measured from August 2003 to September 2004 in a rotation-by-tillage experiment located near Paysandú (northwest of Uruguay). In this area, the climate is mid-latitude humid subtropical according to the Köppen climate classification system, with mean temperatures of 17°C in spring, 25°C in summer, 18°C in autumn, and 12°C in winter. Soil temperatures recorded during this study is shown in Fig. 1a. Rainfall is fairly evenly distributed throughout the year, with a total annual amount of 1,135 mm. The balance rain-evapotranspiration shows water excess in winter and water deficit during the rest of the year. Seasonal distribution pattern of precipitation during the study period is shown in Fig. 1b.

The experimental site was within a long-term experiment established in 1993 on a high fertility soil (Typic Argiudoll, organic C = 29.1 g kg<sup>-1</sup>, pH = 5.7). Treatments were the factorial combination of two tillage practices (conventional tillage = CT and no tillage = NT) and two crop rotations (continuous agriculture = CA and rotation with planted pastures = RP every 3 years), arranged on a completely randomized design (Ernst and Siri-Prieto 2006). Conventional tillage consisted in a combination of moldboard or chisel (20–25-cm depth) and disking (10–15-cm). In no-till plots glyphosate was applied at the rate of 1.4–1.9 kg a.i. ha<sup>-1</sup> depending on weed infestation. In RP the rotation was a 3-year-pasture 4-year-crop cycle. The pasture, which consisted of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), white clover (*Trifolium repens* L.) and tall fescue (*Festuca*



**Fig. 1** Evolution of several soil and climatic variables and soil N<sub>2</sub>O fluxes from natural pasture (NP) or several rotation-tillage combinations (continuous agriculture = CA, agriculture-pasture = RP, conventional tillage = CT and no-till = NT). Stars in **c** and **d** mark the probability of the treatment effect for the significant comparisons ( $P \leq 0.10$ ). Codes Np, N2, and N3 in **c** represent the times of N application to sunflower and barley. Codes Grz in **d** are the times at which cows grazed in RP. Lines with crop names in **d** are the periods in which sunflower or barley grew in the field

*Arundinacea* L.) was planted together with the winter crop in the same planting operation.

During the evaluation period, the RP treatments were occupied by pastures grazed by dairy cattle (60 cows per hectare). Details of tillage operations, crop management activities and grazing dates are provided in Table 1. A natural pasture located nearby was used as control. The pasture was composed mainly of C4 and C3 perennial and annual grasses, located on a area which was never cultivated or planted, resembling other large areas used in the country for beef cattle ranching.

## N<sub>2</sub>O flux measurement

Gas fluxes were measured on an event-driven basis (during 4 days after fertilization, tillage, sowing or rainfall) using the closed chamber technique with six replicates per treatment. Chambers (diameter 0.2 m, height 0.2 m) were inserted 3 cm into the soil. Air samples were withdrawn from chambers at 0, 30 and 60 min via a double-sided needle into 10-ml evacuated vacutainers. Samples were taken between 10:00 and 11:00 h (assumed to represent the average gas flux for that day according to Kessavalou et al. (1998) and analyzed within 10 days of collection. Ambient air (1 m above the surface) and chamber air temperatures, as well as barometric pressure, were measured at the start and end of each gas collection period to calculate STP conditions.

Nitrous oxide analyses were carried out on a Shimadzu GC-14B <sup>63</sup>Ni electron-capture gas chromatograph (Porapak Q column at 70° C, injector 90°C and detector temperature at 300°C). The system was front- and back-flushed to prevent any other gas with a column retention time less or greater than that of N<sub>2</sub>O from entering the analytical column and detector. Fluxes were estimated by the change in gas concentration over time, using the correction described by Hutchinson and Mosier (1981). The net mass flux between two events was calculated as the mean flux value of the two events multiplied by the number of days between these events (Bowden et al. 1990). Cumulative annual mass fluxes were computed by adding all mass flux values for the experimental period and then adjusting this number to an annual basis.

## Soil sampling and analyses

Soil bulk density was determined once at each event (mean of three replications per treatment) and later used to estimate soil water-filled porosity (SWFP). Soil samples within 0–10-cm depth were collected at each event. When an event consisted of 1 or 2 days, only one soil sample per plot was collected. When an event lasted more than 2 days, two soil samples per plot were collected, at the beginning and at the end of the event. Each soil sample was a composite of eight randomly-collected cores. Soil samples were divided in two subsamples. One subsample was dried in a forced air oven at 40°C, ground to pass a 2-mm sieve,



**Table 1** Details of tillage, crop management and grazing activities performed at the Paysandú experiment

	Date	RP	CA-NT	CA-CT
	13-Aug-03	Grazing		
	19-Aug-03		Glyphosate application	Eccentric plow
	7-Oct-03		Glyphosate application	Chisel plow
	14-Oct-03		Sunflower sowing and fertilization	
	14-Nov-03		Herbicide application	
	20-Dec-03	Grazing		
	2-Feb-04	Grazing		
<i>RP</i> = Rotation with pasture	19-Feb-04		Sunflower harvest	
<i>CA-NT</i> = Continuous agriculture under no-till farming	30-May-04		Glyphosate application	Chisel plow
	9-Jun-04		Barley sowing and N-P fertilization (120 of 28–33)	
<i>CA-CT</i> = Continuous agriculture under conventional tillage	21-Jul-04		N fertilization (100 kg ha <sup>-1</sup> of Urea)	
	11-Aug-04		N fertilization (70 kg ha <sup>-1</sup> of Urea)	

and colorimetrically analyzed for exchangeable NH<sub>4</sub> and NO<sub>3</sub> after extraction with KCl 2 M using a solution:soil ratio of 5:1. Ammonium was determined using the modified indophenol blue method described by Mulvaney (1996). In this method, sodium salicylate is used instead of phenol. Nitrate content was determined by colorimetry after reduction through a Cd column (Griess-Ilosvay reaction, Mulvaney 1996).

The second soil sub sample was immediately analyzed for water content, determined gravimetrically after drying subsamples at 104°C for 24 h. Volumetric water content was calculated by multiplying gravimetric water content by bulk density. Soil total porosity was calculated as 1–(bulk density/particle density). Then, SWFP was calculated as the ratio of volumetric water content to soil total porosity (Linn and Doran 1984). In both soils, the assumed value of soil particle density was 2.65 Mg m<sup>-3</sup> (Duran, A. 2003, pers. com.). Results of SWFP are shown in Fig. 1b.

Emissions from each event were averaged across event-days by plot, and only these averages were used in the rest of the analyses. Flux data was analyzed by analysis of variance (ANOVA); the treatment sum of squares was further partitioned into four orthogonal contrasts (NP versus rest, CA versus RP, and CT versus NT within CA and RP treatments). The logarithmic transformation (ln (1 + N<sub>2</sub>O)) was used to normalize the N<sub>2</sub>O flux data, which at some events showed a lognormal distribution. All data were analyzed using the SAS Statistical package

(SAS Institute 2001). The results from both the non-transformed and transformed data were used to interpret the results.

## Results and discussion

### Soil nitrate

Soil NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration varied considerably among and within treatments during the experiment (Fig. 1c). The higher increases were observed after planting and N fertilization of sunflower and barley, and the higher decreases after heavy rains. In two occasions, these decreases coincided with the N<sub>2</sub>O emission peaks (Fig. 1d). The analysis of variance revealed statistically significant differences among treatments (NP excluded from the analyses) in five out of the 13 sampling events (Fig. 1c). Soil NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration, conversely, was fairly constant and low throughout the evaluated period, and did not significantly vary among treatments (data not shown).

The NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration across both tillage types was significantly higher under CA than under RP in ten out of the 13 sampling instances (Fig. 2a). The mean NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration across the whole evaluation period was also significantly higher under CA than under RP, 7.5 vs. 2.6 mg N kg<sup>-1</sup>, respectively. The higher soil NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration in the CA treatments was probably caused by soil disturbance during planting, and by N fertilization of both sunflower (at-planting) and barley (at-planting and after planting)

(Table 1). Moreover, the lower soil  $\text{NO}_3^-$  concentration under RP could be explained by the absorption of mineral N by the pasture, which grew during most of the experimental period. The  $\text{NO}_3^-$  increase observed in the CA treatments during fallow was probably the result of soil N mineralization and nitrification at a time when only a few weeds were growing and absorbing N. The NP treatment showed a similar trend to RP, although the  $\text{NO}_3^-$  concentration was sometimes slightly lower in NP (Fig. 2a).

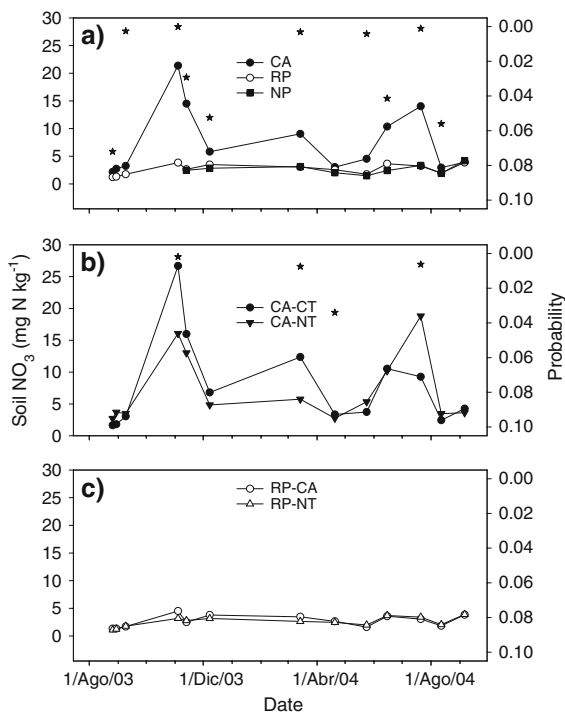
Within the two CA treatments,  $\text{NO}_3^-$  concentrations were often lower under NT (Fig. 2b). These results agree with reports from Brazil and Uruguay (Salet et al. 1997; Bordoli 2001) indicating that soils under NT usually have less mineral N available to plants. This lower available N is a consequence of a lower mineralization rate of crop residues and a higher immobilization rate of soil N, which results in net immobilization and SOM build up during the first

years after NT initiation. Soils under this management also tend to have a lower soil temperature, and hence a lower rate of crop growth and N absorption. A lower soil temperature under NT could help to explain the higher  $\text{NO}_3^-$  concentration observed after N fertilization of barley at planting. It should also be noted that near this sampling time there were few rain events and the SWFP was relatively low (Fig. 1b), conditions which probably limited the occurrence of N losses by leaching or denitrification. Soil  $\text{NO}_3^-$  concentration within the two RP treatments was almost the same, probably because of the absorption of mineral N by the pasture (Fig. 2c).

### Nitrous oxide fluxes

Nitrous oxide fluxes varied highly among events (Fig. 1d). The higher fluxes were recorded in general after rains which produced an increase in SWFP (Fig. 1b) and an important soil  $\text{NO}_3^-$  decrease (Fig. 1c) and/or during periods of high soil temperatures (Fig. 1a). The highest flux ( $99 \text{ g N ha day}^{-1}$ ) was recorded in the CA-CT treatment (Fig. 1d) after one of the highest rainfalls of the year and when soil temperatures were above  $15^\circ\text{C}$ . Such high  $\text{N}_2\text{O}$  fluxes are normally produced by denitrification, for which a prerequisite is the creation of anaerobic zones in the soil (Baggs et al. 2002). This high flux event also coincided with the fallow period, when soil  $\text{NO}_3^-$  built up. The occurrence of flux peaks during fallow has also been observed by other authors; Mosier et al. (2003) have suggested that minimizing fallow could be a practical way to decrease  $\text{N}_2\text{O}$  emissions. At several events, the fluxes were zero or near zero in all treatments, but the lower fluxes were generally observed in the NP treatment (Fig. 1d).

In spring and fall, the mean  $\text{N}_2\text{O}$  emissions of all treatments (except NP) were similar ( $14.8$  and  $15.4 \text{ g N ha day}^{-1}$ , respectively), and higher than in winter ( $5.4 \text{ g N ha day}^{-1}$ ). The most favorable combination of soil temperature and humidity probably increased the chances of denitrification in these two seasons, while in winter the soil biological activity could have been limited by temperature. Although nitrous oxide fluxes were not recorded in summer, we assume that the few rain events during this season may have had little effect on promoting optimal soil humidity for significant emissions to occur. In spite



**Fig. 2** Evolution of soil  $\text{NO}_3^-$  concentrations from natural pasture (NP) or several rotation-tillage combinations (continuous agriculture = CA, agriculture-pasture = RP, conventional tillage = CT and no-till = NT). **a** Shows mean values from CA and RP across tillage treatments and from NP. **b** Show means from CA-CT and CA-NT. **c** Show means from RP-CT and RP-NT. The stars mark the probability of the orthogonal contrasts that were statistically significant ( $P \leq 0.10$ )

of these qualitative relationships between soil-weather conditions and  $N_2O$  losses, regression analyses could not identify any simple or multiple significant correlation between temperature, SWFP, or  $NO_3^-$  with  $N_2O$  fluxes. The logarithmic transformation of the data did not improve these relationships either. This result was not completely unexpected, since according to Lark et al. (2004) correlation analysis may fail to give a consistent picture of the soil factors influencing  $N_2O$  emission.

Contrarily to what was expected, the application of N fertilizer to barley did not produce a noticeable increase of the  $N_2O$  flux above the baseline. This outcome was probably related to the split way of N application (Table 1), which is the recommended method of application for this crop in Uruguay (Hoffman et al. 1999). This split application probably increased the N use efficiency, particularly in the two later application stages. At these stages (Zadoks 22 and Zadoks 30), the crop was actively growing and absorbing nutrients, and hence the amount of mineral N left in the soil for losses was reduced. To this respect, it has been clearly established that there is an inverse relationship between N use efficiency and  $N_2O$  emissions (Kroeze and Mosier 2000). In fact, one of the primary considerations for mitigating  $N_2O$  emissions from agricultural lands is to match the N supply to the spatial and temporal needs of plants. Thus, N application should be regulated through split application when appropriate (Dalal et al. 2003; De Klein et al. 2001). An additional explanation to this lack of N fertilization effect on  $N_2O$  flux was that the rain was scarce during this period, which further prevented the occurrence of large  $N_2O$  emissions. According to Ruser et al. (2001), the amount of rain after fertilization is a key factor in determining the magnitude of  $N_2O$  emissions per unit of fertilizer N applied.

The ANOVAs revealed significant flux differences between treatments at only three events (Fig. 1d), but at each of these events different treatments showed the highest flux. Therefore, the effect of tillage or rotation on  $N_2O$  losses was not consistent along the evaluation period. The logarithmic transformation of the data produced a minor improvement, increasing the number of significant outcomes to four (not shown). This lack of statistical significance could have also been induced by the high flux variability observed in our study, which is not unusual, and

similar results have been reported elsewhere (Thorn-ton and Valente 1996; Flessa et al. 1998; Petersen 1999). It is obvious that under such high variability, only very strong treatment effects could turn out as significant, and therefore dependable conclusions could only be obtained after long-term studies.

Fluxes from natural pastures (NP) were almost always below  $5 \text{ g N ha}^{-1} \text{ day}^{-1}$ , and they were lower than fluxes of the other treatments during most of the evaluation period (Fig. 1d). A lower  $N_2O$  emission from NP could have been expected, because this treatment was the less productive and showed the lowest soil  $NO_3^-$  concentration along the evaluation period, implying that the N cycling was lower in this treatment. A low soil  $NO_3^-$  concentration in NP could have also been predicted, because this treatment was never tilled, planted or fertilized, and it is generally known that mineralization and nitrification rates tend to increase with the degree of soil perturbation. The contrast “NP versus Rest”, however, was significant at only two of nine events (in the first five events NP was not evaluated, data not shown).

Comparisons between mean fluxes in CA and RP (across both tillage types) showed no clear trends, because of the 14 events, the contrasts were significantly higher only twice in each group (data not shown). Moreover, this contrast was not statistically significant at the two events with the largest fluxes (9/12/2003 and 4/20/2004), and aside from statistics each of these two treatments showed the largest flux at one occasion. Analyses with the log-transformed data, however, identified as significant one of the events with the largest flux, where the emission from CA was largest. Therefore, it seems that the same soil conditions were similarly affecting the emissions from both treatments, and that the rotation effect was relatively minor.

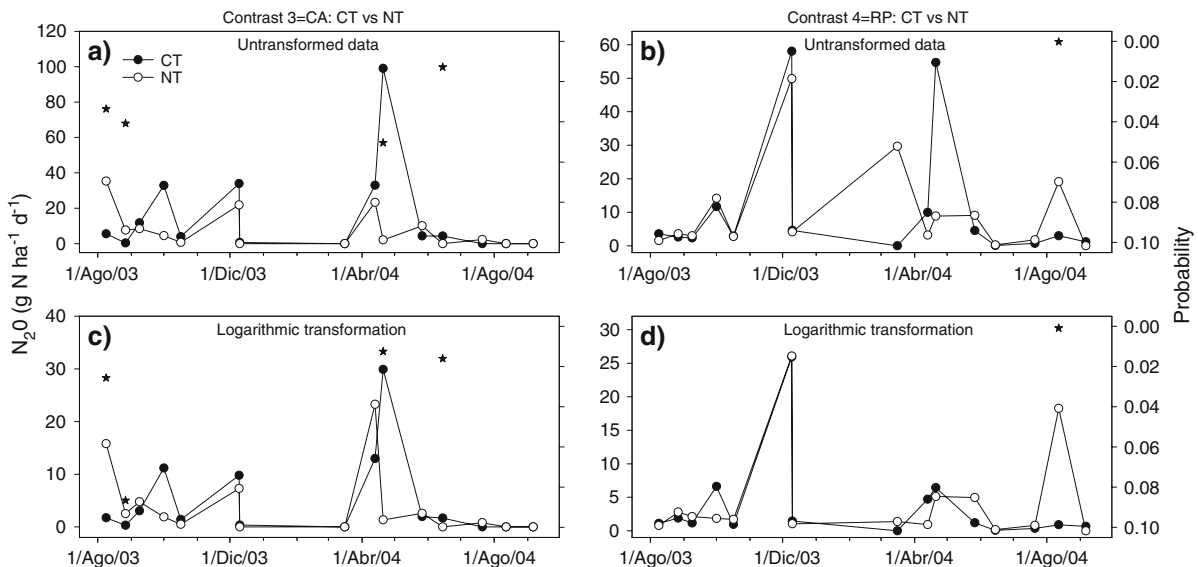
Overall, these findings indicate that natural pastures in Uruguay would produce lower fluxes than either cultivated pasture or agricultural soils. Also, agricultural soils would produce similar  $N_2O$  fluxes, irrespectively of the rotation type. This apparent lack of rotation effect, however, should be considered with caution, not only because of the high flux variability but also because of the poor pasture growth observed in this study, which determined that cows were allowed to graze in only three occasions. The reason for this poor growth could not be identified, but the

same symptoms were observed in other pastures this same year (unpublished data). This result is also in contradiction with reports that legume forage crops tend to have lower annual  $N_2O$  emission than fertilized annual crops (Gregorich et al. 2005). Furthermore, these authors have suggested that when deriving national inventories of greenhouse gases from agricultural systems these two crop types may be considered separately.

Within CA,  $N_2O$  fluxes were significantly higher in CT at three events and once in NT (Fig. 3a). In only two occasions the flux difference between CT and NT was significant, but both treatments showed once a larger significant flux, although the largest flux was observed in CT. Within RP, NT showed a statistically significant higher flux than CA at one event, but at all others the fluxes from both treatments were not different (Fig. 3b). The log transformation produced similar trends, except that within CA both treatments showed the same number of significant events (Fig. 3c, d). These results suggest that the influence of tillage type on  $N_2O$  emissions from Uruguayan soils would be scarce.

This lack of a clear tillage effect on  $N_2O$  fluxes is in opposition with several reports from USA (Smith

et al. 2000, Smith and Conen 2004) and Argentina (Steinbach and Alvarez 2006), which showed higher  $N_2O$  emissions under no-till. In these studies, the larger emission was related either to a higher soil compaction (Smith and Conen 2004) or to a greater soil water content (Steinbach and Alvarez 2006) under NT. However, in our study, neither bulk density (not shown) nor SWFP (Fig. 1b) seemed to be affected by tillage type. To this respect, Thornton and Valente (1996) considered that a complex interaction of processes governing  $N_2O$  concentrations in soils, as well as the cultivation type, could affect these relationships in different directions. On one hand, plowing may increase soil air permeability thus decreasing  $N_2O$  concentrations. On the other hand, organic material may be buried by plowing, which may enforce  $N_2O$  production. The high variability observed in our  $N_2O$  flux data raise questions, however, about the sensibility of field studies to address relatively small differences created by rotations or tillage types, suggesting that with this approach some differences could remain undetected. Our data could also be biased since it was collected during one single year with a particular set of weather conditions. Therefore, more studies would be needed to reach more definitive conclusions.



**Fig. 3** Evolution of  $N_2O$  fluxes from several rotation-tillage combinations (continuous agriculture = CA, agriculture-pasture = RP, conventional tillage = CT and no-till = NT). **a** and **b** shows mean CT and NT fluxes within CA and RP. **c** and

**d** show similar comparisons for the log-transformed data. The stars mark the probability level of the orthogonal contrasts that were statistically significant ( $P \leq 0.10$ )

## Annual emissions

Cumulative annual N<sub>2</sub>O emissions were significantly affected by differences in soil management, but only when the logarithmic transformation was used (Table 2). According to this analysis, there was a significantly lower emission in the NP treatment than in the rest. A similar low N<sub>2</sub>O emission value was recorded this same year in a natural pasture located at another site (unpublished data). The other statistically significant comparison was CT versus NT within CA; in this case CT emitted more than four times N<sub>2</sub>O than NT during the evaluation period (Table 2) although most of this difference was caused by a single event (Fig. 3a). Moreover, measurements made at the same site the previous year showed a higher emission from NT (unpublished data). All other comparisons were not significant, indicating that annual emissions from CA and RP were similar, as were those between tillage treatments within RP.

The higher emission observed in RP treatments in relation to NP could have been expected, because legumes could stimulate N<sub>2</sub>O emissions by excreting N compounds from nodules, thus providing additional substrates for nitrification and denitrification (Rochette et al. 2004). Moreover, the emission values reported in this work for these two systems were within the range reported by other authors. Veldkamp et al. (1998) measured N<sub>2</sub>O fluxes from different pasture types in Costa Rica and reported average

annual emissions from native pastures, legume-grass mixtures, and pastures fertilized with 300 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> of 2.4, 4.3, and 22.6 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>. Later, Plant and Bouman (1999) working with simulation models predicted N<sub>2</sub>O losses in the range of 3–5, 12–15, and 7–28 kg N ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> from these same systems.

Annual emissions predicted using the IPCC methodology (Mosier et al. 1998) would be 0.9 and 1.7 kg N–N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> for continuous agriculture and cultivated pastures respectively, regardless of its management practice (no-tillage or conventional tillage). The predicted emission from the NP treatment would be zero, since this is unmanaged land. The predicted values using IPCC methodology compared well with the estimated means from the ANOVA, especially with the back transformed-means from the log-transformed data (Table 2). Some degree of discrepancy between the estimated means from the log-transformed or untransformed data and the IPCC factors should obviously be expected, because these factors were proposed on a national basis and not at a field scale.

## Conclusions

The first reported data on nitrous oxide fluxes from an agricultural soil of Uruguay showed an irregular pattern along the year. Peak emissions (more than

**Table 2** Cumulative annual N<sub>2</sub>O fluxes from natural pasture (NP) or several rotation-tillage combinations (continuous agriculture = CA, agriculture-pasture = RP, conventional tillage = CT and no-till = NT), and ANOVA results for the log-transformed data (no significant differences found in the untransformed data)

Treatment	Untransformed mean (kg N–N <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> year <sup>-1</sup> )	Log-transformed mean (kg N–N <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> year <sup>-1</sup> )		
NP	0.64	0.07		
CA-CT	5.49	3.77		
CA-NT	1.21	0.44		
RP-CT	2.62	1.35		
RP-NT	4.26	1.72		
Source	DF	SS	P	
ANOVA of the log-transformed data				
Treatment	4	38.0429	0.03286	
Contrast NP versus rest	1	23.839	0.00979	
Contrast CA versus RP	1	0.173	0.81183	
Contrast CA: CT versus NT	1	13.845	0.04234	
Contrast RP: CT versus NT	1	0.183	0.80639	
Error	22	65.576	NA	

NA Not applicable



30 g N ha<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) were generally associated with rainfalls and high temperatures (over 15°C), and they were also observed after periods of high nitrate concentration. In spite of these general relationships, a correlation between fluxes and these variables could not be established. In spring and fall, the mean N<sub>2</sub>O emission across all treatments except NP were similar (14.8 and 15.4 g N ha day<sup>-1</sup>, respectively) and higher than in winter (5.4 g N ha day<sup>-1</sup>). The fluxes from crops or cultivated pastures tended to be higher than those from a natural pasture, but the effects of tillage or rotation on N<sub>2</sub>O losses were not consistent along the evaluated period. Contrarily to what was expected, N fertilizer application to crops did not increase N<sub>2</sub>O flux probably due to high N fertilizer use efficiency coupled with a lack of rain near the periods of application. The annual cumulated flows of different treatments compared well with those estimated using IPCC methodology. Further studies, however, are needed to obtain reliable data on N<sub>2</sub>O fluxes from agricultural soils of Uruguay, because our results were obtained during one single year of measurements and furthermore they showed very high spatial and temporal variability.

**Acknowledgments** The project was supported by IAEA and CSIC-UDELAR. We also thank Dr. A. Szogi and Dr. O. Van Cleemput for reviewing this manuscript, Dr. D. Martino for helping with IPCC calculations, and Ing. Agrs. Cecilia Santos, Juan Cano and Mariana Nin for helping with the measurements.

## References

- Baggs EM, Rees RM, Castle K, Scott A, Smith KA, Vinten AJA (2002) Nitrous oxide release from soils receiving N-rich crop residues and paper mill sludge in eastern Scotland. *Agric Ecosyst Environ* 90:109–123. doi:10.1016/S0167-8809(01)00175-X
- Ball BC, Scott A, Parker JP (1999) Field N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in relation to tillage, compaction and soil quality in Scotland. *Soil Tillage Res* 53:29–39. doi:10.1016/S0167-1987(99)00074-4
- Boeckx P, Van Cleemput O (2001) Estimates of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> fluxes from agricultural lands in various regions in Europe. *Nutr Cycl Agroecosyst* 60:35–47. doi:10.1023/A:1012604032377
- Bordoli J (2001) Dinámica de nutrientes y fertilización en siembra directa. In: Diaz Rosello R (ed) Siembra directa en el cono sur. Procisur, Montevideo, Uruguay, pp 289–297
- Bouwman AF (1996) Direct emission of nitrous oxide from agricultural soils. *Nutr Cycl Agroecosyst* 46:53–70. doi:10.1007/BF00210224
- Bowden RD, Melillo JM, Steudler PA, Aber JD (1990) Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the northeastern United States. *J Geophys Res* 95:13997–14005. doi:10.1029/JD095iD09p13997
- Conen F, Dobbie KE, Smith A (2000) Predicting N<sub>2</sub>O emissions from agricultural land through related soil parameters. *Glob Change Biol* 6:417–426. doi:10.1046/j.1365-2486.2000.00319.x
- Dalal RC, Wang W, Robertson GP, Parton WJ (2003) Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Aust J Soil Res* 41:165–195. doi:10.1071/SR02064
- De Klein CAM, Sherlock RR, Cameron KC, van der Weerden TJ (2001) Nitrous oxide emissions from agricultural soils in New Zealand—a review of current knowledge and directions for future research. *J R Soc N Z* 31:543–574
- Ernst O, Siri-Prieto G (2006) Soil organic carbon and total nitrogen in relation to tillage and crop-pasture rotation. *Adv GeoEcology* 38:132–139
- Flessa H, Wild U, Klemisch M, Pfadenhauer J (1998) Nitrous oxide and methane fluxes from organic soils under agriculture. *Eur J Soil Sci* 49:327–335. doi:10.1046/j.1365-2389.1998.00156.x
- García-Préchal F, Ernst O, Siri-Prieto G, Terra J (2004) Integrating no-till into crop–pasture rotations in Uruguay. *Soil Tillage Res* 77:1–13. doi:10.1016/j.still.2003.12.002
- Gregorich EG, Rochette P, Angers DA, VandenBygaart AJ (2005) Greenhouse gas contributions of agricultural soils and potential mitigation practices in Eastern Canada. *Soil Tillage Res* 83:53–72. doi:10.1016/j.still.2005.02.009
- Hoffman E, Perdomo C, Pastorini M, Pons C (1999) (In Spanish.) Analyses of EMBRAPA. Indexes for the management of nitrogen fertilization in malting barley. In: XIX Annual meeting of barley research, Passo Fundo, Brazil 1999
- Hutchinson GL, Mosier AR (1981) Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes. *Soil Sci Soc Am J* 45:311–316
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2001) Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In: Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (eds) Climate Change 2001: The scientific basis. Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp 881
- Intergovernmental Panel on Climate Change (2006) Guidelines for National Greenhouse Inventories. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.htm>
- Kessavalou A, Mosier AR, Doran JW, Drijber RA, Lyon DJ, Heinemeyer O (1998) Fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide, and methane in grass sod and winter wheat-fallow tillage management. *J Environ Qual* 27:1094–1104
- Kroeze C, Mosier AR (2000) New estimates for emissions of nitrous oxide. In: van Ham JEA (ed) Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 45–64
- Lark RM, Milne AM, Addiscott TM, Goulding KWT, Webster CP, O’Flaherty S (2004) Scale and location dependent correlation of nitrous oxide emissions with soil properties: an analysis using wavelets. *Eur J Soil Sci* 55:611–627. doi:10.1111/j.1365-2389.2004.00620.x

- Linn DM, Doran JW (1984) Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soil. *Soil Sci Soc Am J* 48:1267–1273
- Mosier R, Kroeze C, Nevison C, Oenema O, Seitzinger S, Van Cleemput O (1998) Closing the global N<sub>2</sub>O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutr Cycl Agroecosyst* 52:225–248. doi:[10.1023/A:1009740530221](https://doi.org/10.1023/A:1009740530221)
- Mosier AR, Peterson GA, Sherrod LA (2003) Mitigating net global warming potential (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O) in upland crop productions. In: Methane and nitrous oxide international workshop proceedings, Beijing, China. 17–21 November 2003, pp 273–280
- Mulvaney RL (1996) Nitrogen-inorganic forms. In: Sparks DL et al (eds) *Methods of soil analysis. part 3. chemical methods*. ASA and SSSA, Madison WI, pp 1123–1184
- Passianoto C, Ahrens T, Feigl BJ, Steudler PA, do Carmo JB, Melillo JM (2003) Emissions of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and NO in conventional and no-till management practices in Rondônia, Brazil. *Biol Fertil Soils* 38:200–208. doi:[10.1007/s00374-003-0653-y](https://doi.org/10.1007/s00374-003-0653-y)
- Parkin TB, Kaspar TC (2006) Nitrous oxide emissions from corn–soybean systems in the Midwest. *J Environ Qual* 35:1496–1506. doi:[10.2134/jeq2005.0183](https://doi.org/10.2134/jeq2005.0183)
- Petersen SO (1999) Nitrous oxide emissions from manure and inorganic fertilizers applied to spring barley. *J Environ Qual* 28:1610–1618
- Plant RA, Bouman B (1999) Modeling nitrogen oxide emissions from current and alternative pastures in Costa Rica. *J Environ Qual* 28:866–872
- Robertson GP, Paul EA, Harwood RR (2000) Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289:1922–1925. doi:[10.1126/science.289.5486.1922](https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1922)
- Rochette P, Angers DA, Bélanger G, Chantigny MH, Prévost D, Lévesque G (2004) Emissions of N<sub>2</sub>O from alfalfa and soybean crops in Eastern Canada. *Soil Sci Soc Am J* 68:493–506
- Ruser R, Flessa H, Sg R, Beese F, Munch JC (2001) Effect of crop-specific field management and N fertilization on N<sub>2</sub>O emissions from a fine-loamy soil. *Nutr Cycl Agroecosyst* 59:177–191. doi:[10.1023/A:1017512205888](https://doi.org/10.1023/A:1017512205888)
- Salet RL, Vargas LK, Anghinoni I, Kochhann RA, Denardin JE, Conte E (1997) Por que a disponibilidade de nitrogênio e menor no sistema plantio direto? In: *Seminário internacional do sistema plantio direto, 2., Passo Fundo. Anais. Passo Fundo, EMBRAPA – CNPT, Brazil*, pp 217–219, 1997
- SAS Institute (2001) SAS system for Windows. Release 8.02. SAS Inst, Cary, NC
- Smit KA (1999) After the Kyoto protocol: can soil scientists make a useful contribution? *Soil Use Manage* 15:71–75
- Smith KA, Conen F (2004) Impacts of land management on fluxes of trace greenhouse gases. *Soil Use Manage* 20:255–262. doi:[10.1079/SUM2004238](https://doi.org/10.1079/SUM2004238)
- Steinbach HS, Alvarez R (2006) Changes in soil organic carbon contents and nitrous oxide emissions after introduction of no-till in Pampean agroecosystems. *J Environ Qual* 35:3–13. doi:[10.2134/jeq2005.0050](https://doi.org/10.2134/jeq2005.0050)
- Thornton FC, Valente RJ (1996) Soil emissions of nitric oxide and nitrous oxide from no-till corn. *Soil Sci Soc Am J* 60:1127–1133
- Uruguay Ministry of Environment Climate Change Unit (2002) *Uruguay National Greenhouse Gases Inventory Report*. [http://www.cambioclimatico.gub.uy//index.php?option=com\\_content&task=view&id=31&Itemid=46](http://www.cambioclimatico.gub.uy//index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=46)
- Veldkamp E, Keller M, Nuñez M (1998) Effects of pasture management on N<sub>2</sub>O and NO emissions from soils in the humid tropics of Costa Rica. *Global Biogeochem Cycles* 12:71–79. doi:[10.1029/97GB02730](https://doi.org/10.1029/97GB02730)

## Emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en un arrozal: primeras medidas en el sistema productivo uruguayo

Irisarri Pilar<sup>1</sup>, Pereyra Virginia<sup>2</sup>, Fernández Ana<sup>2</sup>, Terra José<sup>3</sup>, Tarlera Silvana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Garzón 809, CP 12900. Sayago. Montevideo, Uruguay.*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Ecología Microbiana y Ambiental. Facultad de Química. Universidad de la República. Avenida General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: starlera@fq.edu.uy*

<sup>3</sup>*Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Treinta y Tres, Uruguay.*

Recibido: 18/5/12 Aceptado: 4/9/12

### Resumen

Los arrozales son fuente de dos importantes gases de efecto invernadero (GEI), metano y óxido nítrico. Como un paso inicial hacia la obtención de información local, se midieron las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O del suelo y de las plantas de arroz mediante la técnica de la cámara estática en experimentos en invernáculo y a campo en el este de Uruguay. En el experimento en invernáculo, se estudió el efecto del momento de inundación (21 y 45 días después de la emergencia) y de la fertilización nitrogenada (0 y 50 kg N ha<sup>-1</sup>) sobre las emisiones. La inundación temprana y la fertilización nitrogenada tendieron a aumentar las emisiones de N<sub>2</sub>O. En el experimento a campo, se estudió el efecto de la cobertura invernal y de la fertilización nitrogenada (0 y 82 kg N ha<sup>-1</sup>). Se detectaron mayores flujos de CH<sub>4</sub> durante la etapa reproductiva de la planta en el tratamiento fertilizado con cobertura invernal previa de raigrás. El flujo de N<sub>2</sub>O fue máximo después de los baños. Los resultados indican que el uso del cultivo de cobertura podría incrementar las emisiones de GEI durante el ciclo del arroz. A pesar de las distintas prácticas de manejo del cultivo empleadas en Uruguay, los flujos de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O se encuentran dentro de los valores informados previamente para arrozales de otras partes del mundo.

**Palabras clave:** suelo inundado cultivado con arroz, gases de efecto invernadero, fertilización N

### Summary

## CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O Emissions in a Rice Field: First Measurements in the Uruguayan Productive System

Irrigated rice fields are major sources of two important greenhouse gases (GHG), methane and nitrous oxide. As an initial step towards obtaining local information, emissions of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O from rice paddy soil were measured by the static chamber technique in greenhouse and field experiments conducted in eastern Uruguay. In the greenhouse experiment, the effect of two flooding moments (21 and 45 days after emergency) and nitrogen fertilization (0 and 50 kg N ha<sup>-1</sup>) on gas emissions was studied. Early flooding and nitrogen fertilization tended to increase N<sub>2</sub>O emissions. In the field experiment, effect of winter soil cover crop and nitrogen fertilization (0 and 82 kg N ha<sup>-1</sup>) were tested. Higher CH<sub>4</sub> fluxes were observed mainly during the reproductive stage of the plant in the N-fertilized treatment with ryegrass winter crop. N<sub>2</sub>O flux peaked at flushing. Results indicate that the use of cover crops might increase GHG emissions during the rice cycle. Despite differences in agronomic management practices employed in Uruguay, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O fluxes are within magnitudes previously reported for rice fields worldwide.

**Key words:** rice paddy soil, greenhouse gases, N fertilization.



## Introducción

Los suelos agrícolas son fuentes globales importantes de metano ( $\text{CH}_4$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (IPCC, 2007). En Uruguay, el  $\text{CO}_2$  capturado por los montes forestales casi duplica su emisión, razón por la que  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  resultan los principales gases de efecto invernadero (GEI). Se estima que la agropecuaria es responsable del 92,6 % de las emisiones de  $\text{CH}_4$  y de casi la totalidad de las de  $\text{N}_2\text{O}$  (MVOTMA *et al.*, 2010). Los gases de efecto invernadero (GEI) tienen diferente capacidad de calentamiento, basado en su impacto en la energía radiante y su duración en la atmósfera respecto al gas de referencia, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). El  $\text{CH}_4$  y el  $\text{N}_2\text{O}$  tiene un potencial de calentamiento 25 y 298 veces mayor que el  $\text{CO}_2$  respectivamente, para una escala de tiempo de 100 años (IPCC, 2007).

El arroz es el principal cultivo irrigado en Uruguay, un 55% del área cultivada está en la zona Este del país y aproximadamente un 90% de la producción se exporta (ACA, 2011). En el inventario nacional de GEI emitidos se estima que el cultivo de arroz es responsable de un 4% del  $\text{CH}_4$  emitido en Uruguay (MVOTMA *et al.*, 2010). Uno de los desafíos ambientales de los sistemas que incluyen el cultivo de arroz con inundación es reducir la emisión de GEI producidos principalmente por actividades microbianas. Las emisiones están fuertemente influenciadas por la fertilización nitrogenada, el manejo del suelo y de los residuos de la cosecha durante el barbecho y el manejo del agua de riego. El cultivo de arroz es considerado la principal fuente antropogénica global de  $\text{CH}_4$  (Jacobson, 2005). Las emisiones de  $\text{CH}_4$  dependen del cultivar de arroz (Kerdchoechuen, 2005), pero también aumentan por la incorporación de materia orgánica al suelo (Yagi y Minami, 1990; Bronson *et al.*, 1997), y su mitigación se basa en la reducción del tiempo en que el cultivo permanece inundado (Yagi *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1997).

El  $\text{N}_2\text{O}$  se produce mayoritariamente en la interfase entre suelo seco e inundado (Cai *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2002). Su emisión depende del drenado del suelo (Towprayoon *et al.*, 2005) y se estimula con la fertilización nitrogenada (Bronson *et al.*, 1997; Crutzen y Lelieveld, 2001). La emisión de  $\text{CH}_4$  resulta del balance entre las actividades de las arqueas metanogénicas, estrictamente anaeróbicas, y las bacterias metanótrofas, aeróbicas (Macalady *et al.*, 2002). Por otra parte, el  $\text{N}_2\text{O}$  es producto de las transformaciones microbianas incompletas de los compuestos nitrogenados incorporados al suelo como fertilizante, bajo condiciones óxicas (nitrificación) o anóxicas (desnitrificación principalmente y nitrificación desnitrificante)

(Smith *et al.*, 2003; Baggs y Philippot, 2011). El cultivo de arroz en Uruguay es único en el mundo ya que comparte el uso de suelos con pasturas para la ganadería y otros cultivos en rotación (ACA, 2011). El arroz integrado a esos sistemas produce altos rendimientos con aplicación de bajas dosis de agroquímicos y conserva la calidad del suelo (Deambrosi, 2003; Méndez *et al.*, 2003). El comercio mundial presenta crecientes exigencias sobre los impactos ambientales de los procesos productivos y su documentación, incluyendo la exigencia de uso del agua, destino medioambiental de agroquímicos y emisión de GEI entre otros (Itoh *et al.*, 2011). El objetivo de este trabajo fue obtener los primeros datos locales de emisiones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$  en el sistema particular de producción de arroz en nuestro país. Además se realizó una primera aproximación al impacto de algunas prácticas de manejo, fertilización nitrogenada, manejo del agua y coberturas invernales, sobre los flujos de estos GEI.

## Materiales y métodos

### Experimento en invernáculo

El experimento de invernáculo se desarrolló en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) del departamento de Treinta y Tres. Se sembró arroz (*Oryza sativa* L., cultivar «El Paso 144») en cajones de plástico con suelo tomado de los 0,30 m superiores en la Unidad Experimental «Paso de la Laguna» del INIA Treinta y Tres, con las siguientes características: textura franco limoso, pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 5,2;  $\text{N-NH}_4^+$  0,3  $\text{mmol L}^{-1}$ ; C orgánico 30-35  $\text{g kg}^{-1}$  y materia orgánica 50-55  $\text{g kg}^{-1}$ . La densidad aparente del suelo fue 1,36  $\text{g cm}^{-3}$ . Este ensayo se realizó para evaluar los efectos del momento de inundación y la fertilización nitrogenada sobre las emisiones. Se utilizó un diseño de parcelas al azar, con cuatro repeticiones y dos cámaras en cada cajón.

Se colocaron 52 kg de suelo por cajón y se aplicó una fertilización basal con 120  $\text{kg ha}^{-1}$  de fosfato de amonio (18-46-0). El arroz se sembró con una densidad de 180  $\text{kg ha}^{-1}$  y las plántulas se regaron semanalmente hasta capacidad de campo. El tratamiento con nitrógeno consistió en la aplicación de urea 50  $\text{kg ha}^{-1}$  al macollaje y a los 21 días después de la emergencia (DDE) de las plántulas. Las plantas de arroz emergieron nueve días después de la siembra. El tratamiento de manejo del agua consistió en dos fechas de establecimiento de la inundación, 21 DDE (inundación temprana) y 45 DDE (inundación tardía). El nivel de agua durante la inundación se mantuvo en 5-6 cm por encima del suelo hasta la cosecha, que se realizó a los 134 DDE.

### Experimento de campo

El experimento se realizó en la Unidad Experimental Paso de la Laguna del INIA, (33°16'S, 54°16'W) durante la zafra de arroz 2008-09 para conocer el efecto de la inclusión de cultivos de cobertura invernal sobre las emisiones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O durante el cultivo de arroz. El suelo era Albic Natraqualf (USDA, 1998) con tres años previos de descanso sin arroz. Las características físico-químicas del suelo se muestran en el Cuadro 1.

Los tratamientos fueron el arreglo factorial de dos manejos del suelo durante el invierno, raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.) como cobertura o suelo desnudo, y dos dosis de fertilización nitrogenada, 0 y 82 kg N ha<sup>-1</sup>. El diseño fue de parcelas al azar de 10 m x 9,2 m con cuatro repeticiones y dos cámaras en cada parcela. El raigrás se sembró el 30 de marzo a una densidad de 20 kg de semillas ha<sup>-1</sup>, 10 días después de una aplicación de 1,5 kg ia ha<sup>-1</sup> de glifosato (Terra *et al.*, 2009). El tratamiento de suelo desnudo (sin vegetación) recibió el 20 de junio una segunda dosis de glifosato, además de la del 20 de marzo. En ambos tratamientos el barbecho químico se inició el 19 de setiembre con una aplicación de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato. La materia seca total cosechada de raigrás fue 4940 kg ha<sup>-1</sup> con una relación C/N de 47/1 (Terra *et al.*, 2009). El laboreo del

suelo se realizó el verano previo (enero 2008) y consistió en una pasada de excéntrica pesada, dos pasadas de ras-tra de discos y dos pasadas de *landplane*.

El cultivo de arroz (cv. INIA Olimar) se instaló el 13 de octubre con siembra directa a una densidad de 150 kg de semilla ha<sup>-1</sup>. La inundación se realizó 22 DDE y se mantuvo una lámina de agua de 10 cm hasta cinco días antes de la cosecha. Se realizaron dos baños previos a la inundación del cultivo, a los 1 y 4 DDE.

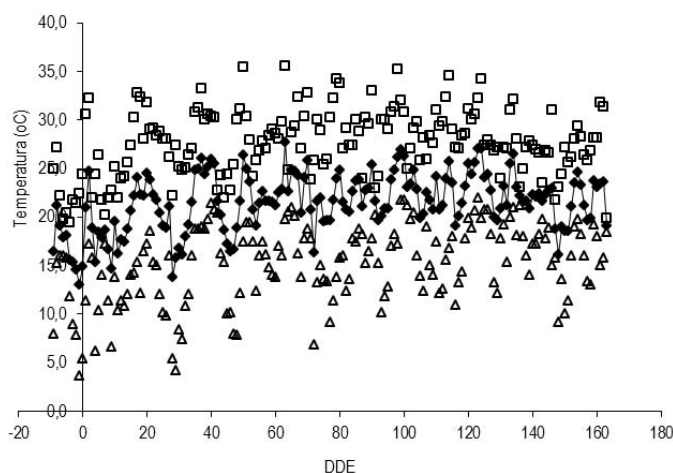
La fertilización nitrogenada fraccionada consistió en la aplicación, a la siembra, de fosfato de amonio (22 kg N ha<sup>-1</sup>, 23 DDE), urea al macollaje (21 DAE) 30 kg N ha<sup>-1</sup> sobre suelo seco, y al primordio (51 DDE) 30 kg N ha<sup>-1</sup>. Los tratamientos sin N no recibieron ninguna aplicación de fertilizante nitrogenado.

Los parámetros de rendimiento como peso de grano ajustado al 13%, número de tallos m<sup>-2</sup>, granos por panoja, materia seca en etapas de floración y primordio, se evaluaron según Terra *et al.* (2009). La estimación del contenido de clorofila de las hojas del arroz se midió en la hoja superior más desarrollada con un SPAD 502 Plus Chlorophyll meter (Terra *et al.*, 2009).

La información meteorológica se registró en la estación ubicada en «Paso de la Laguna». La temperatura promedio fue 21,5 °C durante el ciclo del cultivo (Figura 1) y la

**Cuadro 1.** Propiedades del suelo en el ensayo de campo.

pH(H <sub>2</sub> O)	C orgánico (g kg <sup>-1</sup> )	N total (g kg <sup>-1</sup> )	P Bray (μgg <sup>-1</sup> )	K disponible (meq100g <sup>-1</sup> )
5,4±0,17	19,0±1,7	1,7±0,1	7,8±0,9	14,6±4,8



**Figura 1.** Temperatura diaria durante el ciclo de producción de arroz. Los rombos negros indican la temperatura media, los cuadrados la máxima y los triángulos la mínima. DDE: días después de emergencia.

precipitación 576 mm, de los cuales solo se registraron 36 mm previo a la inundación. La amplitud térmica tuvo un valor promedio de 12 °C a lo largo del ciclo del arroz.

### Muestreo y mediciones de flujos de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O

Los flujos de gases emitidos se monitorearon usando la técnica de cámaras cerradas estáticas descritas para arroz por Lindau *et al.* (1991) en las fechas indicadas para cada experimento en las Figuras 3 y 4 y entre las 13 y 15 h. Las cámaras consistieron en bases de acero inoxidable de 40 cm de diámetro y 20 cm de altura parcialmente insertas (5 cm) en el suelo que permanecieron instaladas durante todo el ciclo de cultivo. En cada fecha de muestreo se colocaron cilindros de acrílico de 60 cm de altura sobre las bases con un sello de agua para evitar el escape de gases. Las cámaras contaban con un ventilador operado con una batería que se prendía cinco minutos antes de cada medición para asegurar la homogeneidad de la atmósfera dentro de la cámara y un dispositivo para equilibrar la presión interna y la externa (Figura 2). Las muestras de gases del interior de las cámaras se tomaron con jeringas plásticas de 25 mL a los tiempos 0, 30 y 60 minutos y se almacenaron en tubos con vacío (10mL) hasta su análisis. Se registraron la temperatura de las cámaras, la profundidad del agua de inundación y la altura del espacio de aire en cada cámara para calcular los flujos de gases con el tiempo. Las concentraciones de CH<sub>4</sub> se analizaron con un cromatógrafo de gases Chrompack CP 9001 equipado con un detector FID (detector de ionización de llama). El análisis de N<sub>2</sub>O se realizó con un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B modificado con detector ECD (de captura electrónica) descrito en Perdomo *et al.* (2009). La tasa de emisión de ambos gases se calculó según Watanabe *et al.* (2000):  $F = \bar{n} \cdot h \cdot (dC/dt)$ ; donde  $F$  corresponde a la tasa de emisión de N-N<sub>2</sub>O o C-CH<sub>4</sub> en g ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>;  $\bar{n}$  es la densidad de N-N<sub>2</sub>O o C-CH<sub>4</sub> corregida por la temperatura existente en el interior de la cámara de muestreo;  $h$  es la altura de la cámara desde el suelo o el nivel de agua, y  $dC/dt$  es el incremento de la concentración de N<sub>2</sub>O o CH<sub>4</sub> dentro de la campana con el tiempo. Previamente al cálculo de tasas de emisión, se confirmó para cada caso la existencia de una relación lineal entre la concentración del gas correspondiente y el tiempo. La tasa de emisión obtenida para las repeticiones de cada tratamiento fue promediada para determinar el valor final de emisión por tratamiento.

El flujo integrado estacional emitido (Fie) se calculó a partir de las áreas bajo las figuras de emisiones de gases durante todo el tiempo del cultivo del arroz para cada una de las cámaras.



**Figura 2.** Foto de los cilindros de acrílico utilizados para las mediciones de gases.

### Análisis de suelo

Se colectaron muestras compuestas al azar de ocho cilindros de 0-10 cm de profundidad para determinar nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Las muestras se secaron en estufa de aire forzado a 40 °C, se pasaron por tamiz de 2 mm y el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se analizó por colorimetría después de su extracción con KCl 2M en relación 5:1. El contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se determinó después de su reducción a través de una columna de Cd (reacción de Griess-Ilosvay; Mulvaney, 1996).

### Análisis estadístico

Los datos de emisión obtenidos en los ensayos de invernáculo y campo fueron evaluados ajustando Modelos de Efectos Mixtos mediante el Software R (2009). Para el análisis de los resultados obtenidos en invernáculo, se consideraron los tratamientos (combinaciones de distintos momentos de inundación y niveles de fertilización nitrogenada), la covariable tiempo y su interacción como efectos fijos, mientras que las repeticiones fueron consideradas como efectos aleatorios. Los datos del ensayo de campo fueron analizados considerando la covariable tiempo, las coberturas invernales, el nivel de fertilización nitrogenada y la interacción entre estas dos últimas variables como efectos fijos.

Se comparó mediante un análisis de varianza (ANOVA) el ajuste de modelos alternativos a los grupos de datos y se seleccionó el modelo más adecuado. Se aplicó un análisis de varianza ( $P=0,05$ ) a los resultados obtenidos con el modelo finalmente ajustado.

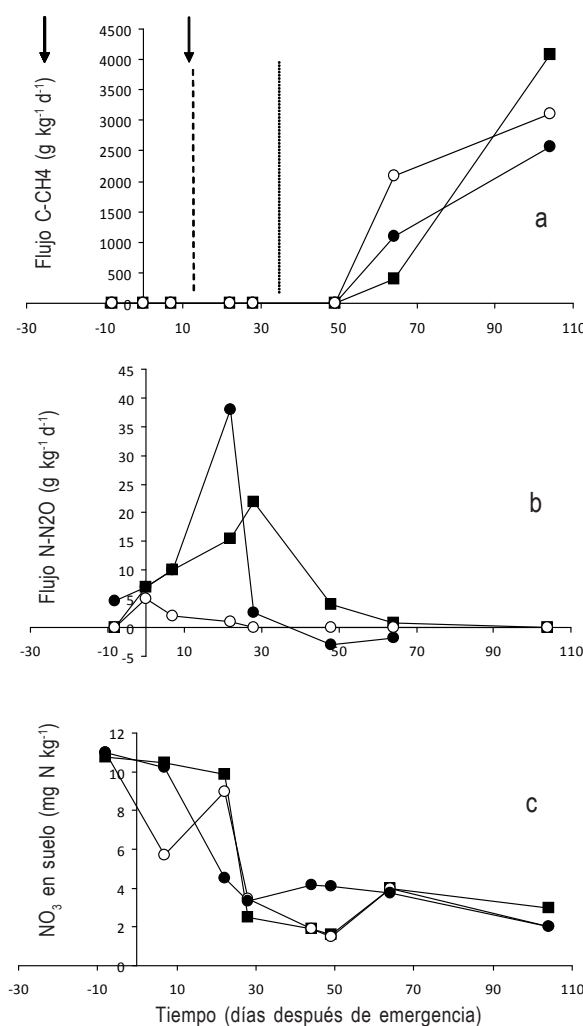
## Resultados y discusión

### Ensayo en invernáculo

La Figura 3a muestra los flujos de CH<sub>4</sub> de los experimentos en invernáculo. No se detectaron emisiones de CH<sub>4</sub> durante el período de crecimiento vegetativo del arroz (0 a 50 DDE), independiente de la fecha de inundación. Este período abarcó hasta los 34 días después de la inundación en el tratamiento de inundación temprana y cinco días en la inundación tardía. En ambos tratamientos el estadio del arroz a los 50 DDE, cuando se detectó la emisión de CH<sub>4</sub>, era macollaje avanzado.

Para el tratamiento de inundación temprana, el primer valor de emisión fue detectado cinco semanas después de la inundación, mientras que para inundación tardía fue dos semanas después de inundado el cultivo. En esa fecha (64 DDE), con ambos tratamientos en estadio de iniciación de la floración, no se registraron diferencias significativas entre las emisiones. A los 104 DDE, el arroz estaba en etapa de floración en el tratamiento de inundación tardía, pero las plantas sometidas a inundación temprana estaban más adelantadas, en etapa de maduración. La práctica de adelantar el comienzo de la inundación ha sido reportada como promotora de la madurez del cultivo (Deambrosi, 2003). Coincidentemente con nuestros resultados, se ha comunicado que alrededor de un 90% del total del CH<sub>4</sub> en todo el ciclo de cultivo se emite en floración, debido al máximo incremento de la biomasa en esa etapa (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986; Schütz *et al.*, 1989; Neue *et al.*, 1997).

En el Cuadro 2 se observa el efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento de arroz con inundación temprana. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas en los flujos de CH<sub>4</sub> entre estos tratamientos. Los resultados comunicados sobre el efecto de los fertilizantes-N minerales y la emisión de CH<sub>4</sub> en arrozales inundados son contradictorios (Wassmann *et al.*, 1993). Diferentes estudios han revelado que es un efecto relativamente complejo que aún no se comprende cabalmente (Bodelier *et al.*, 2000), ya sea porque estimula o reprime las principales poblaciones microbianas involucradas en la generación y oxidación de CH<sub>4</sub>. Debe considerarse además que la fertilización no solo afecta a los microorganismos sino



**Figura 3.** Evolución del flujo de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O y contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el suelo en el experimento de invernáculo según el momento de inundación (DDE: días después de emergencia) y la fertilización nitrogenada. (a) Emisión de CH<sub>4</sub>; (b) emisión de N<sub>2</sub>O; (c) concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en suelo. Tratamientos: 21 DDE (círculos vacíos); 21 DDE + N (círculos llenos); 45 DDE + N (cuadrados llenos). Las flechas indican el momento de aplicación del fertilizante. Las líneas verticales indican el momento de inundación: (—) 21 días y (...) 45 días. Cada punto de las gráficas corresponde a la media del flujo calculado a partir de ocho cámaras estáticas (dos en cada parcela).

también a las plantas, agregando complejidad al resultado final. Estos resultados sugieren que los flujos de CH<sub>4</sub> son dependientes de la etapa de desarrollo de la planta y que la inundación tendría una influencia indirecta en la emisión de CH<sub>4</sub> al regular el ciclo del cultivo.



**Cuadro 2.** Rendimiento de grano del arroz en el ensayo de invernáculo<sup>1</sup>.

Tratamiento <sup>2</sup>	kg ha <sup>-1</sup>
21 DDE	6709 ± 666 <sup>b</sup>
21 DDE + N	8084 ± 897 <sup>a</sup>
45 DDE + N	8457 ± 807 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Se muestran los valores de rendimiento y su error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

<sup>2</sup>Tratamiento: combinación de momento de establecimiento de la inundación (DDE: días después de emergencia) y aplicación de fertilizante nitrogenado (+ N).

El pico más alto de  $N_2O$  (38 g N ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) se registró en el tratamiento de inundación temprana al día siguiente de la fertilización con urea e inundación (Figura 3b) y este flujo fue significativamente diferente al de los demás tratamientos ( $p < 0,01$ ). Este evento coincidió con una disminución de la concentración de  $NO_3^-$  del suelo (Figura 3c). Este pico de emisión de  $N_2O$  podría atribuirse a la aplicación de fertilizante-N si se compara con el tratamiento con la misma fecha de inundación pero sin fertilizar y en el que las emisiones de  $N_2O$  permanecieron bajas y constantes a lo largo del ciclo del cultivo. Sin embargo, la inundación en sí misma contribuyó a este incremento de la emisión si comparamos ambos tratamientos fertilizados. En la misma fecha, para el tratamiento que permanecía sin inundar se registró menor flujo de  $N_2O$  (14 g N ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>).

Durante el período sin inundar, las emisiones de  $N_2O$  probablemente se debieron a la nitrificación del  $NH_4^+$ . Cuando el suelo se inundó en forma temprana (21 DDE), los microorganismos desnitrificantes actuaron sobre el pool de  $NO_3^-$  liberado por la nitrificación produciendo  $N_2O$ . La desnitrificación es considerada normalmente la principal fuente de  $N_2O$  en los suelos (Kravchenko y Yu, 2006). El flujo de  $N_2O$  disminuyó drásticamente después que el suelo permaneció inundado en forma permanente (lámina de agua de 10 cm) (Figura 3b), lo que puede atribuirse a la recaptura del  $N_2O$  y reducción a  $N_2$  en condiciones de anaerobiosis estricta. De hecho, una de las formas de mitigar las emisiones de  $N_2O$  que más se estudia actualmente es el aumento de la reducción de  $N_2O$  a  $N_2$  (Baggs *et al.*, 2010). En el tratamiento 45 DDE, la inundación se realizó con el arroz en macollaje tardío, cuando el  $NO_3^-$  disponible para la desnitrificación era menor debido probablemente a una mayor absorción por las plantas. Los flujos de  $N_2O$  fueron apenas

detectables durante el resto del ciclo del cultivo de arroz (Figura 3b).

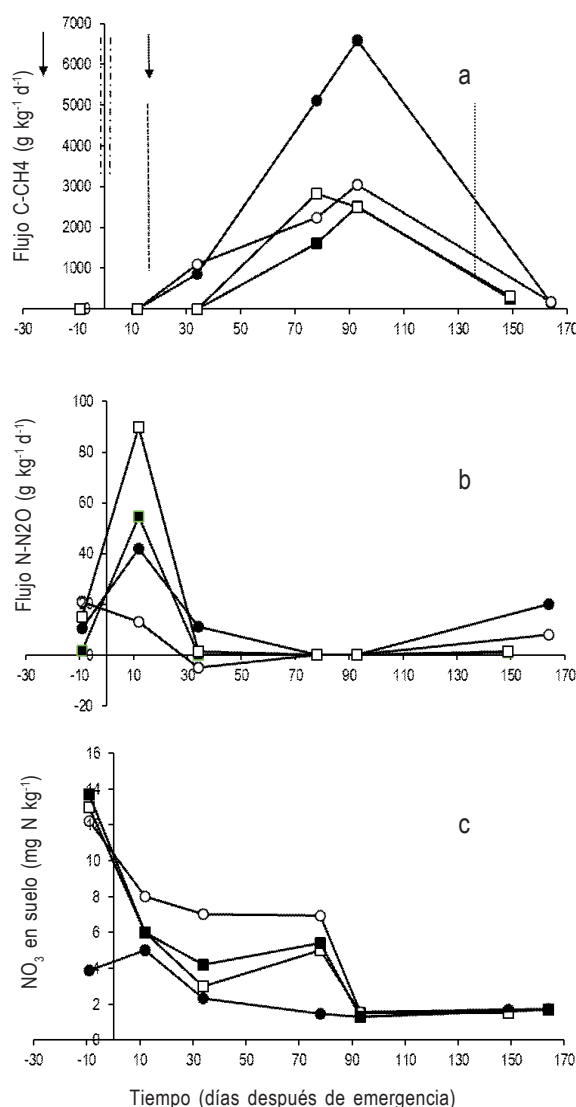
### Ensayo de campo

Los patrones de emisión de  $CH_4$  fueron similares para el cultivo de arroz con los dos manejos del suelo en el invierno previo: raigrás y suelo sin vegetación (Figura 4a). Sin embargo, la emisión de  $CH_4$  comenzó a registrarse dos semanas después de la inundación (34 DDE) en las parcelas que habían tenido raigrás como cobertura, mientras que en ese momento la emisión fue despreciable para las parcelas sembradas en suelo sin vegetación. De igual forma que en el ensayo de invernáculo, el flujo de  $CH_4$  aumentó en la fase reproductiva (inicio de floración, 78 DDE) y el pico máximo se registró a los 93 DDE (floración) en todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan con reportes previos que mostraron una correlación positiva entre una alta producción de  $CH_4$  y la etapa de floración, debido al aumento de los exudados radicales orgánicos en este estadio de la planta (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986).

En varios estudios se ha enfatizado en que el aumento de los flujos de  $CH_4$  en las etapas tardías del crecimiento de la planta sería causado por la proliferación de exudados radicales o productos de la autólisis de raíces (Holzapfel-Pschorn *et al.*, 1986; Lindau *et al.*, 1991; Neue y Sass, 1994; Chidthaisong y Watanabe, 1997). El Cuadro 3, indirectamente, ilustra este punto ya que en la floración se observó un aumento considerable en la materia seca de todos los tratamientos. Como una consecuencia de este aumento en la biomasa hubo una mayor disponibilidad de carbono descomponible proveniente de los exudados radicales que, a su vez sirven como fuente de carbono y energía para la microflora. Después de la cosecha (149 y 163 DDE, para suelo desnudo y raigrás respectivamente) se registraron muy pocas emisiones.

Se observó una interacción significativa ( $p = 0,01$ ) entre la cobertura con raigrás y la fertilización-N, con los mayores flujos de  $CH_4$  para el tratamiento de arroz fertilizado y con raigrás como cobertura invernal. Generalmente se considera que los diferentes agregados orgánicos estimulan el flujo de  $CH_4$  al aumentar el suministro de carbono para los metanógenos (Yagi *et al.*, 1996; Bronson *et al.*, 1997; Wassmann *et al.*, 2000). Especialmente, si el material incorporado tiene una alta relación C/N, como en el caso del rastrojo de raigrás. La absorción de nutrientes por la planta deja menos N disponible para los microorganismos y por lo tanto el N podría estar limitando la actividad bacteriana.

El rendimiento de arroz del tratamiento con raigrás, independientemente de la dosis de N, fue menor (Cuadro 3).



**Figura 4.** Evolución del flujo de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O y contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el suelo en el experimento de campo según la cobertura invernal previa y la fertilización nitrogenada. (a) Emisión de CH<sub>4</sub>; (b) emisión de N<sub>2</sub>O; (c) concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en suelo. Tratamientos: raigrás (círculos vacíos); raigrás + N (círculos llenos); suelo sin vegetación (cuadrados vacíos); suelo sin vegetación + N (cuadrados llenos). Las flechas indican el momento de aplicación del fertilizante. Las líneas verticales indican el momento de inundación: (—) 21 días DDE, de aplicación de baños (- -) y el drenaje (...) previo a la cosecha. Cada punto de las gráficas corresponde a la media del flujo calculado a partir de ocho cámaras estáticas (dos en cada parcela).

**Cuadro 3.** Parámetros de rendimiento en el ensayo de campo<sup>1</sup>.

Tratamiento <sup>2</sup>	Rendimiento de grano (kg ha <sup>-1</sup> )	Materia seca en iniciación de la panoja (kg ha <sup>-1</sup> )	Materia seca en floración (kg ha <sup>-1</sup> )	Contenido de clorofila en iniciación de la panoja (unidades SPAD)	Contenido de clorofila en floración (unidades SPAD)	Número de panojas m <sup>2</sup>	Granos por panoja
Sin vegetación	10370 ± 925 a	5637 ± 1781 a	9840 ± 1832 b	35,8 ± 1,2 bc	36,2 ± 2,6 a	581 ± 146 a	117 ± 8 ab
Sin vegetación + N	11233 ± 324 a	6194 ± 531 a	13375 ± 2839 a	31,8 ± 2,4 c	33,2 ± 2,4 b	510 ± 62 a	100 ± 20 b
Raigrás	8777 ± 1543 b	1837 ± 262 c	5052 ± 1011 c	36,2 ± 3,6 ab	39,9 ± 1,7 a	313 ± 59 b	123 ± 16 a
Raigrás + N	9870 ± 904 ab	3405 ± 706 b	7199 ± 564 bc	36,6 ± 2,2 a	40,8 ± 1,1 a	352 ± 63 b	133 ± 8 a

<sup>1</sup>Se muestran los valores y su desviación estándar. Los valores seguidos de distintas letras fueron significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

<sup>2</sup>Tratamiento: combinación de cobertura invernal previa y fertilización nitrogenada (+ N) durante el cultivo de arroz.

Ambos tratamientos presentaron menor acumulación de materia seca, número de panojas por m<sup>2</sup> y granos por panoja. Por el contrario, la tendencia del contenido de clorofila fue opuesta, con los mayores valores observados en los tratamientos de raigrás independientemente de la fertilización. Recientemente, Baruah *et al.* (2010) han reportado una correlación positiva entre la emisión de CH<sub>4</sub> y la actividad fotosintética.

Como se observa en Figura 4b se pudo detectar una emisión inicial de N<sub>2</sub>O en todos los tratamientos. Este pico de N<sub>2</sub>O ocurrió inmediatamente después de un baño en un momento en que los contenidos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del suelo habían disminuido (Figura 4c). En estas condiciones redox del suelo, tanto los organismos nitrificantes como los desnitrificantes podrían ser los principales productores de N<sub>2</sub>O (Müller *et al.*, 2004). Aunque no hubo diferencias significativas, los tratamientos que habían tenido cobertura invernal mostraron una tendencia a reducir su emisión de N<sub>2</sub>O antes de establecida la inundación respecto al los suelos sin cobertura. De hecho, el uso de cultivos de no-leguminosas en invierno se ha postulado como un práctica efectiva para reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O (Gomes *et al.*, 2009), debido a una competencia con los microorganismos del suelo por el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disponible. No hubo un efecto significativo de la fertilización con N sobre los flujos de N<sub>2</sub>O en ningún tratamiento. Generalmente se acepta que la emisión de N<sub>2</sub>O aumenta inmediatamente después de la fertilización en suelos secos (Bronson *et al.*, 1997; Yagi *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1997). En el caso del arroz que se sembró directamente sobre el barbecho de raigrás, los microorganismos podrían haber inmovilizado N debido a la alta relación C/N del raigrás. Sin embargo Dobermann y Cassman (2002) han sugerido que el principal factor que afecta la emisión de N<sub>2</sub>O es la velocidad de recambio del N, tomando en cuenta la sincronización entre mineralización de N y absorción por la planta. La aplicación fraccionada de N, método recomendado de aplicación para este cultivo, probablemente aumente la eficiencia de uso del N por la planta (Irsarri *et al.*, 2007), lo cual tiene una relación inversa con la emisión de N<sub>2</sub>O (Kroeze y Mosier, 2000). Un evento de un pequeño flujo de emisión de N<sub>2</sub>O se midió después de drenar el campo al final del cultivo. Este flujo podría deberse a la liberación del N<sub>2</sub>O atrapado en el suelo y a las condiciones redox óptimas para la producción de N<sub>2</sub>O. Los cultivos de no-leguminosas se han reportado como eficientes consumidores del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> residual del suelo (Gomes *et al.*, 2009) y por lo tanto capaces de reducir sus pérdidas. De este modo, durante la etapa en que el cultivo de arroz no está ocupando el suelo, deben

medirse las emisiones a efectos de considerar el sistema global.

Por último, ambos experimentos, en invernáculo y a campo, mostraron que la emisión de CH<sub>4</sub> coincidió con la etapa reproductiva del arroz, mientras que la emisión de N<sub>2</sub>O estuvo más influenciada por las prácticas agrícolas tales como el manejo del agua, la fertilización nitrogenada y el uso previo del suelo. Aunque nuestros datos fueron obtenidos durante una sola zafra, con condiciones climáticas particulares, los resultados de los ensayos de invernáculo y de campo son consistentes.

### Flujos estacionales

El Cuadro 4 muestra los flujos acumulados de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O a lo largo del ciclo del cultivo de arroz. Si bien las fechas de muestreo son escasas para sacar conclusiones definitivas, los flujos integrados de CH<sub>4</sub> fueron en todos los casos por lo menos 18 veces mayores que los de N<sub>2</sub>O en equivalentes de CO<sub>2</sub> (en 100 años). Aunque el N<sub>2</sub>O es un gas de efecto invernadero mucho más potente que el CH<sub>4</sub> en términos de calentamiento global, su emisión estacional por hectárea fue mucho más baja.

El Fie (flujo integrado estacional emitido) de CH<sub>4</sub> del arroz fertilizado posterior a una cobertura invernal con raigrás fue significativamente mayor que el de los demás tratamientos (Cuadro 4). Una posible explicación de este resultados es que la combinación de siembra directa, cobertura de raigrás y fertilización nitrogenada pudo haber aumentado el suministro de carbono a los organismos metanogénicos (Wassmann *et al.*, 2000). En el caso del N<sub>2</sub>O, ninguno de los tratamientos registró una emisión estacional diferente al resto, aunque la alta variabilidad de los Fie pudo haber ocultado los efectos potenciales de los tratamientos. Debe considerarse además, que las tasas de emisión pueden estar sobreestimadas ya que las mediciones de los flujos se realizaron en el período más caluroso del día (13:00 -15:00 h), cuando ocurren las máximas tasas de emisión (Hou *et al.*, 2000).

La mediana de las emisiones estacionales de otros arrozales irrigados en diferentes partes del mundo varía en un rango entre 34 g CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> (China) a 25 g CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> (USA). Nuestros datos estacionales oscilan entre 17 y 21 g CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> para el arroz sembrado sobre suelo desnudo en invierno, y entre 32 y 64 g CH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> para el cultivo sembrado sobre la cobertura de raigrás. De acuerdo a nuestros resultados el establecimiento de una cobertura invernal de raigrás aumentó el flujo de CH<sub>4</sub>. Una revisión reciente de las emisiones de N<sub>2</sub>O de varios arrozales reporta medias estaciona-

**Cuadro 4.** Flujo integrado estacional emitido (Fie) de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O por el cultivo de arroz en el ensayo de campo<sup>1</sup>.

Tratamiento <sup>2</sup>	Fie CH <sub>4</sub> (kg C-CH <sub>4</sub> ha <sup>-1</sup> )	Fie CH <sub>4</sub> (CO <sub>2</sub> equiv. 100 años)	Fie N <sub>2</sub> O (kg N-N <sub>2</sub> O ha <sup>-1</sup> )	Fie N <sub>2</sub> O (CO <sub>2</sub> equiv. 100 años)
Sin vegetación	156 <sup>b</sup>	4368	0,5 <sup>a</sup>	243
Sin vegetación + N	129 <sup>b</sup>	3612	0,4 <sup>a</sup>	195
Raigrás	242 <sup>b</sup>	6776	0,4 <sup>a</sup>	195
Raigrás + N	482 <sup>a</sup>	13496	1,1 <sup>a</sup>	535

<sup>1</sup>Los valores seguidos por letras distintas fueron significativamente diferentes a p<0,01.

<sup>2</sup>Tratamiento: combinación de cobertura invernal previa y fertilización nitrogenada (+ N) durante el cultivo de arroz.

les de  $0,667 \pm 0,885$  kg N ha<sup>-1</sup>, lo que revela la gran variabilidad en el flujo de este GEI y la consiguiente dificultad para comparar datos (Akiyama *et al.*, 2005). Por otro lado, al comparar los valores de las emisiones por hectárea hay que considerar los altos rendimientos de arroz en Uruguay (8000 - 8500 kg ha<sup>-1</sup>; ACA 2011) y los rendimientos promedio de los países asiáticos (5000 kg ha<sup>-1</sup>, AFSIS). Esto resultaría en menores emisiones en equivalentes CO<sub>2</sub> por kg de arroz en el caso de Uruguay, aunque sería necesario aumentar las fechas de muestreo para convalidar esta conclusión.

Las medidas de estos gases durante el transcurso del día y durante el invierno permitirían obtener datos de emisión anual que serían comparables a las emisiones reportadas por otros países.

## Conclusiones

Esta primera aproximación a la emisión de GEI en arrozales uruguayos confirmó que el CH<sub>4</sub> es el principal gas emitido y que los patrones de emisión de ambos gases tienen un comportamiento opuesto a lo largo del ciclo del cultivo. El arroz sembrado sobre una cobertura de raigrás y fertilizado con nitrógeno emitió más del doble de CH<sub>4</sub> que el sembrado sobre suelo desnudo. Tanto en el ensayo de invernáculo como en el de campo las mayores emisiones de CH<sub>4</sub> coincidieron con la etapa reproductiva del arroz, mientras que en el caso del N<sub>2</sub>O se produjeron en la fase vegetativa y estuvieron influenciadas por el manejo del agua y la fertilización nitrogenada. Estos resultados preliminares sobre el efecto de algunas prácticas de manejo del cultivo sobre las emisiones de GEI refuerzan la necesidad de contar con datos locales que contribuyan a elaborar el inventario nacional de GEI, el cálculo de la huella de C y el diseño de estrategias de mitigación de las emisiones.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por INIA-FPTAN° 238. Agradecemos por su colaboración en las mediciones a: Estefanía Geymonant, Mariana Urraburu, Leticia Pérez y Germán Pérez.

## Bibliografía

- ACA. 2011. Datos estadísticos [En línea]. Consultado 12 diciembre 2011. Disponible en: [http://www.aca.com.uy/index.php?option=com\\_content&view=section&layout=blog&id=3&Itemid=9](http://www.aca.com.uy/index.php?option=com_content&view=section&layout=blog&id=3&Itemid=9)
- Akiyama H, Yagi K, Yan X. 2005. Direct N<sub>2</sub>O emissions from rice paddy fields: summary of available data. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(1): GB1005.
- Baggs EM, Philippot L. 2011. Nitrous oxide production in the terrestrial environment. En: Moir JWB. [Ed.]. Nitrogen cycling in bacteria. Norfolk: Caister Academic Press. pp. 211-232.
- Baggs EM, Smales CL, Bateman EJ. 2010. Changing pH shifts the microbial source as well as the magnitude of N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Biology and Fertility of Soils* 46: 793 - 805.
- Baruah KK, Gogoi B, Gogoi P. 2010. Plant physiological and soil characteristics associated with methane and nitrous oxide emission from rice paddy. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16: 79 - 91.
- Bodelier PL, Ršlev P, Henckel T, Frenzel P. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soils around rice roots. *Nature*, 403: 421 - 424.
- Bronson KF, Neue HU, Singh U, Abao EB. 1997. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil: I. Residue, nitrogen, and water management. *Soil Society of American Journal*, 61: 981-987.
- Cai Z, Laughlin R, Stevens RJ. 2001. Nitrous oxide and dinitrogen emissions from soils under different water regimes and straw amendment. *Chemosphere*, 42: 113 - 121.
- Cai ZC, Xing GX, Yan XY, Xu H, Tsuruta H, Yagi K, Minami K. 1997. Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilisers and water management. *Plant and Soil*, 196: 7 - 14.
- Chidthaisong A, Watanabe I. 1997. Methane formation and emission from flooded rice soil incorporated with <sup>13</sup>C-labeled rice straw. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1173 - 1181.
- Crutzen PJ, Lelieveld J. 2001. Human impact on atmosphere chemistry. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 29: 17 - 45.
- Deambrosi E. 2003. Rice production system in Uruguay and its sustainability. En: Proceedings of the III International Conference of Temperate Rice; Punta del Este, Uruguay. Montevideo: INIA. p. 19.



- Dobermann A, Cassman KG.** 2002. Plant nutrient management for enhanced productivity in intensive grain production systems of the United States and Asia. *Plant and Soil*, 247: 153 - 175.
- Gomes J, Bayer C, de Souza F, Costa M, de Cássia Piccol Zanatta JA, Beber Vieira FC, Six J.** 2009. Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. *Soil Tillage Research*, 106: 36 - 44.
- Holzappel-Pschorn A, Conrad R, Seiler W.** 1986. Effect of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant and Soil*, 92: 223 -233.
- Hou AX, Chen GX, Wang ZP, Van Cleemput O, Patrick WH.** 2000. Methane and nitrous oxide emissions from a rice field in relation to soil redox and microbiological processes. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 2180 -2186.
- IPCC.** 2007. Climate change 2007 : The physical science basis. Cambridge : Cambridge University Press. pp. 137 - 153.
- Irsarri P, Gonnnet S, Deambrosi E, Monza J.** 2007. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 237 - 243.
- Itoh M, Sudo S, Mori S, Saito H, Yoshida T, Shiratori Y, Suga S, Yoshikawa N, Suzue Y, Mizukami H, Mochida T, Yagi K.** 2011. Mitigation of methane emissions from paddy fields by prolonging midseason drainage. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 141: 359 - 372.
- Jacobson MZ.** 2005. Atmospheric pollution: history, science and regulation. New York : Cambridge University Press. pp. 3 - 226.
- Kerdchoechuen O.** 2005. Methane emission in four rice varieties as related to sugars and organic acids of roots and root exudates and biomass yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 108: 155-163.
- Kravchenko IK, Yu K.** 2006. Relationship between major soil properties and culturable microorganisms affecting methane and nitrous oxide dynamics in rice soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 52: 607-615.
- Kroeze C, Mosier AR.** 2000. New estimates for emission of nitrous oxide. En: van Ham JEA [Ed.]. Non-CO2 Greenhouse gases: scientific understanding, control and implementation. Netherlands : Kluwer Academic Publishers. pp. 45 - 64.
- Lindau CW, Bollich PK, Delaune RD, Patrick WH, Law VJ.** 1991. Effect of urea fertilizer and environmental factors on CH4 emissions from a Louisiana, USA rice field. *Plant and Soil*, 136: 195 - 203.
- Macalady JL, MacMillan AMS, Dickens AF, Tyler SC, Scow KM.** 2002. Populations dynamics of type I and II methanotrophs bacteria in rice soils. *Environmental Microbiology*, 4: 148 - 157.
- Méndez R, Deambrosi E, Blanco P, Saldain N, Pérez de Vida F, Gaggero M.** 2003. Technology for rice seeding with reduced or no-till for the Eastern zone of Uruguay. En: Proceedings of the III International Conference of Temperate Rice; Punta del Este, Uruguay. Montevideo: INIA. p. 64.
- Müller C, Stevens RJ, Laughlin RJ, Jäger HJ.** 2004. Microbial processes 1 and the site of N2O production in a temperate grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 453 - 461.
- Mulvaney RL.** 1996. Chemical Methods Nitrogen - inorganic forms. En: Methods of Soil Analysis : Part 3. Madison : Soil Science Society of America. pp. 1162-1171.
- MVOTMA, DINAMA, Unidad de Cambio Climático.** 2010. Tercera comunicación nacional a la conferencia de las partes en la convención marco De las naciones unidas sobre cambio climático: Resumen ejecutivo. Montevideo: MVOTMA. 34 p.
- Neue H-U, Sass RL.** 1994. Trace gas emissions from rice fields. En: Prinn RG. [Ed.]. Global atmospheric-biospheric chemistry. New York : Plenum Press. pp. 119-147.
- Neue H-U, Wassmann R, Kludze HK, Bujun W, Lantin RS.** 1997. Factors and processes controlling methane emissions from rice fields. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49: 111-117.
- Perdomo C, Irsarri P, Ernst O.** 2009. Nitrous oxide emissions from an uruguayan argiudoll under different tillage and rotation treatments. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 84: 119 -128.
- Schutz H, Holzappel-Pschorn H, Conrad R, Rennenberg H, Seiler W.** 1989. A three-year continuous record on the influence of day time season and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy. *Journal of Geophysical Research*, 94: 16405-16416.
- Smith KA, Ball T, Conen F, Dobbie KE, Massheder J, Rey A.** 2003. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere : interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, 54: 779 - 791.
- Terra J, Sanchez A, Deambrosi E, Méndez R.** 2009. Efecto de cultivos de cobertura invernal sobre la respuesta a N en el cultivo de arroz en siembra directa. En: Arroz : Resultados experimentales 2009 - 2010. Montevideo : INIA. (Actividades de Difusión ; 611). pp. 9 - 20.
- Towprayoon S, Smakgahn K, Poonkaew.S** 2005. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. *Chemosphere*, 59: 1547 - 1556.
- USDA.** 1998. Keys to Soil Taxonomy. 8th ed. Washington : USDA. 326p.
- Wassmann R, Neue HU, Lantin RS, Makarim K, Chareonsilp N, Buendia LV, Rennenberg H.** 2000. Characterization of methane emissions from rice fields in Asia : II. Differences among irrigated, rainfed and deepwater rice. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 58: 13 - 22.
- Wassmann R, Papen H, Rennenberg H.** 1993. Methane emission from rice paddies and possible mitigation strategies. *Chemosphere*, 26: 201 - 217.
- Watanabe T, Chairaj P, Tsuruta H, Masarngsan W, Wongwiwatchai C, Wonprasaid S, Cholitkul, W, Minami K.** 2000. Nitrous oxide emissions from fertilized upland fields in Thailand. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 58: 55 - 65.
- Xing GX, Shi SL, Shen GY.** 2002. Nitrous oxide emissions from paddy soil in three rice based cropping systems in China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64: 35 - 43.
- Yagi K, Minami K.** 1990. Effect of organic matter application 1 on methane emission from some Japanese paddy fields. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36: 599 - 610.
- Yagi K, Tsuruta H, Kanda K, Minami K.** 1996. Effect of water management on methane emission from a Japanese rice field: automated methane monitoring. *Global Biogeochemical Cycles*, 10: 255 - 267.

## **Yield-scaled global warming potential of two irrigation managements in a highly productive rice system in Uruguay**

Tarlera S, Capurro MC, **Irisarri P**, Fernández A, Cantou G, Roel A.

Enviado a Paddy and Water Environment (Feb/2014)

### **Abstract**

Water management has been shown to impact both methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from rice paddy fields. Controlled irrigation is one of the most important tools both in rice production and in CH<sub>4</sub> emission attenuation. However, it can also increase N<sub>2</sub>O emissions and reduce yields. Therefore, the tradeoff relationship between both greenhouse gases emission (GHG) and the effect on productivity must be assessed. Over 3 years, two different irrigation systems were compared, the conventional water management (continuous flooding after 30 days of emergence, CF30); and an alternative system (controlled deficit irrigation allowing wetting and drying, AWDI) in a rice field in Uruguay. AWDI showed mean cumulative CH<sub>4</sub> emission values of 98.4 kg CH<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup>, 55% lower when compared to CF30 while no significant differences in nitrous oxide emissions were observed among treatments.

No significant yield differences were observed in two of the rice seasons while AWDI recorded a significant yield reduction in one of the seasons. When rice productivity and GHG emissions were considered together, AWDI irrigation system reported lower yield-scaled GWP. No differences were observed in total irrigation water applied and

irrigation water productivity in two of the rice seasons while CF30 reported a higher amount of water applied and lower water productivity in one of the seasons. These findings suggest that AWDI can be an option to reduce GHG emissions and increase water productivity. However, AWDI may compromise grain yield, reflecting the importance of an overall tradeoffs relationships assessment in order to promote farmers adoption.

### **Introduction**

Methane and nitrous oxide are two important greenhouse gases (GHG) that have global warming potentials (GWP) of 25 and 298 times that of carbon dioxide over a

time horizon of 100 years (IPCC 2007). The steady increase in methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) concentration in the atmosphere over several decades partly due to agriculture, has led to enhanced global warming (Smith et al. 2007; IPCC 2007). Methane is the dominant GHG produced in irrigated paddy rice fields contributing approximately 15-20% to the annual global methane emissions (Jacobson 2005; Hadi et al. 2010). Flooded soils generate anaerobic conditions favoring organic matter degradation that produce methane as an end product (Conrad 2002). Methane production is influenced by a number of soil processes as well as common cultivation practices among them water, fertilizer and residue management (Cai et al. 1997; Yan et al. 2005; Linquist et al. 2012). Water management is one of the most important tools to achieve high level of production as well as a promising option for methane mitigation. Several reports showed that alterations to water management such as intermittent irrigation and mid-season drainage are effective options for methane mitigation in irrigated rice fields (Yagi et al. 1997; Minamikawa and Sakai 2006; Tyagi et al. 2010; Hadi et al. 2010; Itoh et al. 2011; Jain et al. 2013). However, these practices of alternate anaerobic and aerobic cycling can stimulate N<sub>2</sub>O emission and therefore an emission trade-off optimum that minimizes emissions of both gases is highly desirable (Zhou et al. 2005; Itoh et al. 2011). N<sub>2</sub>O is produced in soils via the biogeochemical processes of nitrification and denitrification that are greatly influenced by soil water status. The dry-wet alternation after mid-term drainage creates a favorable environment for both nitrification and denitrification processes, which can greatly contribute to higher N<sub>2</sub>O emissions (Zou et al. 2007). Furthermore, drainage systems are also important to conserve water and improve rice yields (Xu et al. 2007).

Rice is the major irrigated crop in Uruguay and about 90% of its production is exported. Uruguay rice yields are among the highest in the world averaging 8000 kg.ha<sup>-1</sup> (Blanco et al. 2010). Uruguay's rice production system has unique characteristics. Rice is produced in rotation with pasture for cattle grazing, typically 1-2 years of rice and 3-4 years of pasture. This indicates that rice accounts for 25-30% of the time in the rotation. The crop is drill or broadcast seeded into dry soils. According to rainfall, flushing may be required (1 or 2 times) to prevent water stress, before establishing the permanent flood 35-45 days after planting. One or two nitrogen top dressings are used at tillering and panicle initiation. In general, 40-70 kg

$P_2O_5$  ha<sup>-1</sup> and no more than 70 kg N ha<sup>-1</sup> are applied. After rice is harvested, forage species are no till-planted (by airplane) to increase beef/sheep production during the periods without rice. Due to the shared use of the soil, rice pesticides (herbicides and fungicides) are applied with low frequency through time (Deambrosi 2003; Roel et al. 2007). Crop-pasture rotations have been the predominant cropping system in Uruguay since the 1960s. Under this management system, soil organic matter content is maintained or increased in relation to the initial level. Fertility, physical and chemical properties are improved quickly with inclusion of pasture in a crop rotation (García-Préchac et al. 2004).

A large proportion of world rice is grown under continuously anaerobic conditions; therefore there is a lack of reports regarding methane and nitrous oxide emissions for systems like that of Uruguay where there is an initial 30 days of aerobic condition. Hence, there is very little information regarding local GHG emission factors. Little is known regarding the integrated effects of greenhouse gases emissions, water consumption and productivity on direct-seeded, delayed-flood rice production systems in temperate paddy fields. van Groenigen et al. (2010) proposed to evaluate GHG emissions from agriculture as a "greenhouse gases intensity" or "yield-scaled" approach where cumulative emissions are divided by crop yield in order to indicate an agricultural efficiency value .

In a three-year field experiment, two different irrigation systems were compared, the conventional water management (continuous flooding after 30 days of emergence, CF30); and an alternative system (controlled deficit irrigation allowing wetting and drying, AWDI) in southeastern Uruguay in order to study their effect on GHG emission, water productivity and rice yields.

## **Materials and Methods**

Methane and nitrous oxide emission rates were measured during three consecutive rice growing seasons (2010-2013) from October to March in field experiments planted to rice cultivar of indica origin, El Paso 144, conducted at the Experimental Station of the National Agricultural Research Institute of Uruguay (INIA) in Treinta y Tres located in the southeast of Uruguay, (33°14'S, 54°23'W). The soil was loamy clay, and according to USDA Taxonomy a Typic Argiudoll. Main properties of the soil for the three rice growing seasons are described in Table 1.

Table 1 Soil properties for the three rice growing seasons (October-March for the southern hemisphere)

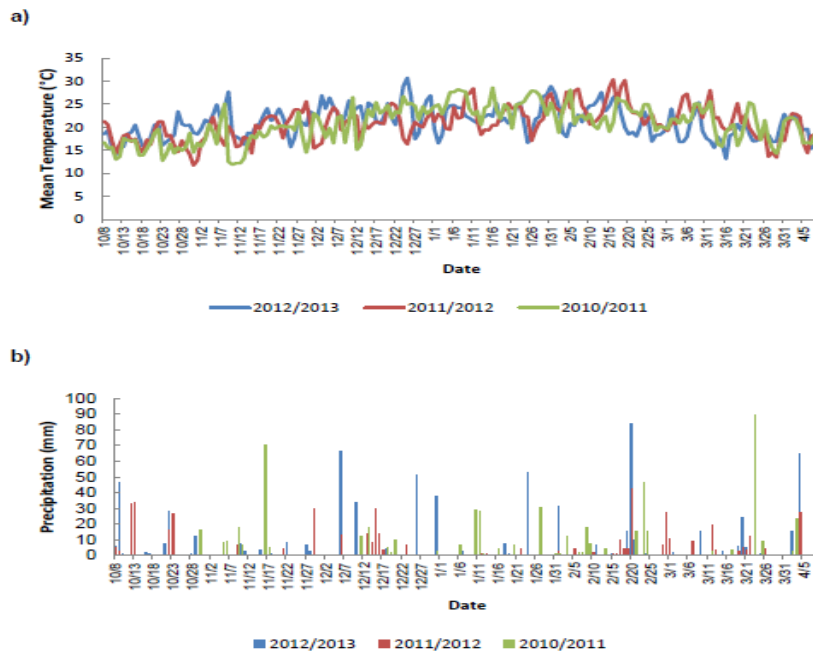
Season	pH (H <sub>2</sub> O)	Organic matter (%)	P Bray ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Available K (meq 100 g <sup>-1</sup> )
1	6.0	2.2	5.0	0.12
2	5.5	1.9	5.0	0.18
3	6.3	2.3	2.2	0.16

Rice was seeded at a density of 150 kg ha<sup>-1</sup> after a three-year pasture.

Daily mean temperature between 20 days before and 20 days after 50% flowering, was 23°C in the three seasons studied. Mean daily temperature and daily rainfall in the three seasons are shown in Fig. 1 (a and b).

A complete randomized block design with two irrigation treatments and three replications evaluated over three growing seasons was used. The irrigation treatments were a conventional water management and an alternative controlled deficient irrigation.

The conventional water management consisted in a continuous flooding treatment applied 30 days after plant emergence (CF 30) and a water depth of 10 cm above the soil surface was maintained during the rest of the growing season until final drainage. This water management is the most frequently employed among Uruguayan rice producers.



**Fig. 1 a** Mean daily temperature in the three crop seasons **b** Rainfall in the three crop seasons

The alternate treatment consisted in an alternate wetting and drying irrigation (AWDI), where irrigation was given only at a certain number of days, when the soil reached 50% depletion of the available water in the root zone. This treatment started also at 30 days after plant emergence and continued till panicle initiation stage, around 70 DAE. At this stage, the plots were flooded with a 10 cm water depth similarly to the other treatment (Fig. 2). Both treatments were direct-seeded and occasionally flushed during the first 30 days to prevent severe water stress depending on rainfall conditions. For both treatments, irrigation end-point was set at 15 days after 50% of flowering and plots were drained 15 days before harvesting. Each plot of 66 m<sup>2</sup> had an independent irrigation inlet where water inflow was measured using ARAD WM 50 flow meters to record the amount of water used for irrigation. Details of crop management activities are provided in Table 2.

Table 2. Seasonal sequence of crop management events (Month/Day/Year)

Season 1	Season 2	Season 3	Crop management
10/8/2010	10/22/2011	10/19/2012	Planting and fertilization (16 Kg.ha <sup>-1</sup> N, 66 Kg.ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 18 Kg.ha <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> O)
11/10/2010	11/9/2011	11/3/2012	Plant emergence

10/30 and 11/19/2010	10/30 and 11/22/2011	11/12 and 11/29/2012	Herbicide application
12/13/2010	12/9/2011	12/3/2012	Fertilization at tillering (60 kg urea.ha <sup>-1</sup> )
CF30:1/3/2011 AWDI:1/13/2011	CF30:1/6/2012 AWDI:1/20/2012	CF30:12/28/2012 AWDI:1/7/2013	Fertilization at panicle differentiation (50 kg urea.ha <sup>-1</sup> )*
CF30:12/13/2010 AWDI:1/13/2011	CF30:12/9/2011 AWDI: 1/20/2012	CF30:12/3/2012 AWDI:1/7/2013	Flooding

\*Urea application in dry soil previous flooding in CF30 , and before the first irrigation in AWDI

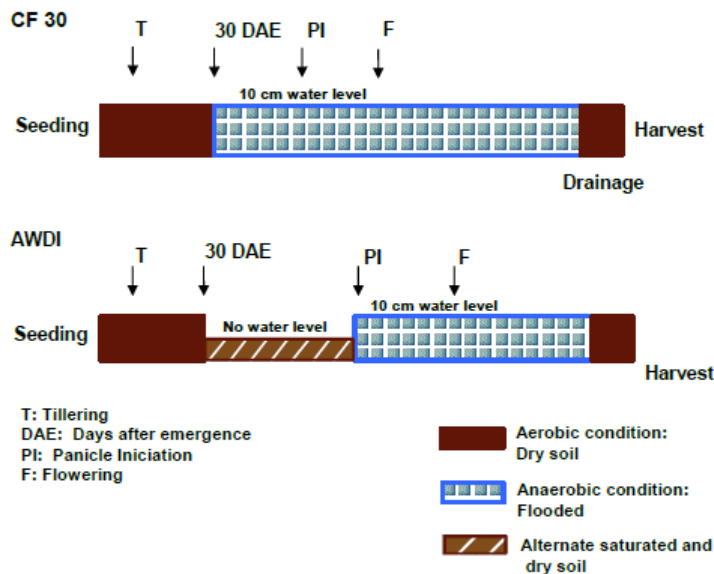


Fig 2. Scheme of the crop cycle and irrigation treatments

### Gas sampling and flux measurement

CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions were monitored using the static closed chamber technique as described for rice by Lindau et al. 1991. The assembly consisted of permanently installed stainless steel bases, 40 cm in diameter and 20 cm in height that were left in place inserted 10 cm into the soil. At each sampling date, acrylic boxes of 60 cm height were placed on the bases and a water-seal was established to provide air-tight conditions. The chamber was equipped with a battery-operated circulating fan which was turned on 5 min before measurements to ensure complete gas mixing and a device to equilibrate pressure between the inside and the outside of the chamber. Gas samples from the chamber headspace were drawn using 25 ml plastic syringes at 0, 30 and 60 min for CH<sub>4</sub> and at 0, 15 and 30 min for N<sub>2</sub>O and two replicates were stored in evacuated 105 ml glass tubes until analysis. Two chambers were installed in each plot. Chamber temperature, floodwater depths and headspace heights were

recorded and used to calculate gas flux rates from the soil surface to the chamber atmosphere by the linear increase of gas concentration over time. The frequency of flux measurements was generally every 7 days which has been determined to be an accurate approach for estimating seasonal CH<sub>4</sub> emissions from rice systems (Minamikawa et al. 2012). Gas fluxes measurements were performed between 10 and 11.30 am, as recommended by Minamikawa et al. (2012). CH<sub>4</sub> concentrations were analyzed on a GC-2014 gas chromatograph (Shimadzu Scientific) with a Porapak Q column equipped with a FID detector (N<sub>2</sub>O analysis was carried out on a modified Shimadzu 14B gas chromatograph with an ECD detector as described in Perdomo et al. (2009).

The overall gas emissions during the study period were calculated by integrating the fluxes with the duration of the experiment. A cubic model was adjusted to calculate seasonal total CH<sub>4</sub> emissions while seasonal N<sub>2</sub>O emissions were calculated by adding all mass flux values for the experimental period. The net N<sub>2</sub>O mass flux between two measurement dates was calculated as the mean flux values of the two dates multiplied by the number of days between these dates (Bowden et al. 1990). Total Global Warming Potential (GWP) was calculated as CO<sub>2</sub> equivalents (CO<sub>2</sub> eq) over a 100-year time horizon using a radiative forcing potential of 298 for N<sub>2</sub>O and 25 for CH<sub>4</sub> relative to CO<sub>2</sub> (Houghton et al. 2001). Yield-scaled GWP refers to GWP divided by grain yield.

#### Soil and plant measurements

Water applications for the AWDI irrigation treatments were based on the cumulative crop evapotranspiration (ET<sub>m</sub>). The Penman-Monteith equation (FAO 56PM) to estimate potential evapotranspiration (ET<sub>o</sub>) was used. ET<sub>m</sub> was calculated multiplying ET<sub>o</sub> by the crop coefficient of rice. Irrigation was applied when cumulative ET<sub>m</sub> was equal to 50% depletion of the available water in the root zone. Precipitation data was registered at a meteorological station located at the Experimental field and the soil water content was daily measured in situ using a frequency domain reflectometry device (FDR), Decagon EC5, with 5cm rod length, at 0-10cm soil depth.

Redox potential was measured in the season 2012-13, using a Horiba D-52 manual platinum electrode which performs instantaneous value measurements. The measurements were taken between rows with a 10 cm depth and 5 replicates for each



plot. Rice yields were assessed by crop-cut sampling in each plot using a 3 x 2m sampling frame. Reported grain yield refers to weight of rough rice adjusted to 14% grain moisture content.

#### Statistical analysis

Differences for Cumulative rice seasonal CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions, GWP, grain yield, and yield-scaled GWP were compared between irrigation treatments using a linear Mixed Model in SAS® version 9.3 (SAS Institute Inc., 2004) with the PROC MIXED procedure. Irrigation treatment was considered a fixed-effect while blocks, cropping season, and treatment-by-cropping system interaction were included as random effects. A regression model for seasonal CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O was fitted by using PROC REG in SAS to estimate regression parameters. Analysis of variance was performed across seasons unless significant season by treatment interactions were detected.

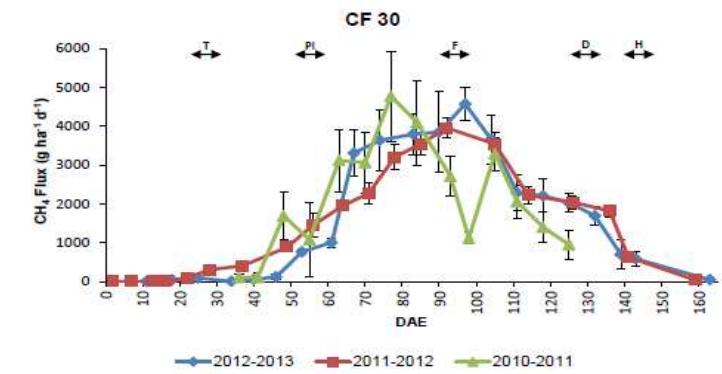
## **Results and Discussion**

### Seasonal patterns of CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions

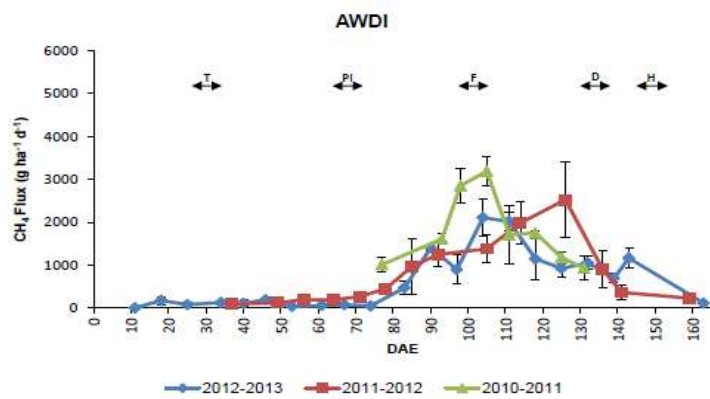
For all years and water-management treatments, a similar seasonal methane emission pattern was observed (Fig. 3a and b). Methane emission increased gradually over time after flooding and reached a recognizable peak around flowering, in the late reproductive stage of the crop after which emissions gradually declined until field drainage or harvesting. The highest methane emission rates for CF30 ranged from 3948-4766 g ha<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> whereas for AWDI they ranged from 2105-3189 g ha<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Fig. 3a and b) and were higher for CF 30 (p= 0.0016). For the three years, methane emissions peaked around seven weeks after flooding irrespective of the treatment. While the highest flux was measured 2 days before flowering in CF 30, in AWDI it was registered 12 days before flowering (p= 0.024) Total methane fluxes during the cropping period from CF30 method were significantly higher (249.4 and 248.8 kg CH<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup>) than those from AWDI in the last two seasons (106.3 and 95.7 kg CH<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup>) accounting for a 57 and 62 % reduction, respectively (Table 3). Even considering only the period while both irrigations treatments were flooded (from panicle initiation to drainage) registered fluxes were significantly higher for CF 30. Our estimates are comparable to previously published rates from rice fields from temperate countries. Reports from continuously irrigated systems include values of

kg CH<sub>4</sub> ha<sup>-1</sup> 174 : 634 (Hadi et al. 2010), 250 (Cicerone et al. 1992) , 112-404 (Schütz et al. 1989), 200-500 (Gutierrez et al. 2013) from Japan, California, Italy and Korea, respectively. Two most similar continuously irrigated systems (direct-seeded, delayed flood) to ours have reported values of 270 (Rogers et al. 2012) and 340-423 (Freire et al. 2013) from rice fields in Arkansas, USA and southern Brazil, respectively.

Soil redox potential (Eh) was measured in the third year of the experiment. This parameter showed a different pattern for both water treatments (Fig. 4). In the CF30 treatment, soil redox potential was above + 300 mV before flooding and then decreased sharply to a level of -100 mV within about 30 days (Fig. 4). On the other hand, Eh values for AWDI treatment gradually decreased to 100 mV until 46 DAE. This was followed by transient increases and decreases in the redox potential during the intermittent drainage until flooding in the field was well established and Eh values became negative (Fig. 4). This soil Eh fluctuation between 10 and 70 DAE corresponds with minimal CH<sub>4</sub> flux detected in AWDI fields, not surprisingly since soil Eh did not decline in this period to a proper range favorable for the activity of methanogens. As a consequence, CH<sub>4</sub> emission from AWDI treatment was delayed compared to CF30. Soil water content variations reflected soil redox potential fluctuations (data not shown). Almost two weeks were required to activate the methanogens and CH<sub>4</sub> emissions increased with time under flooded period for both treatments and peaked around two months later when the Eh value was the lowest.

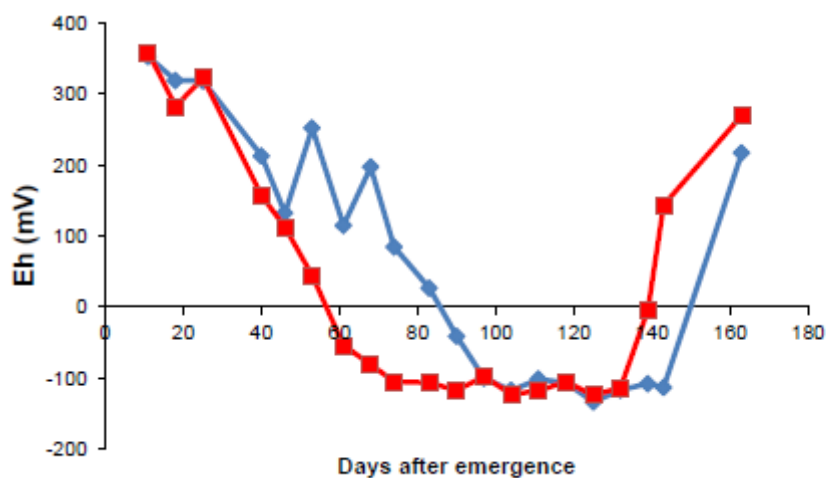


a)



b)

**Fig. 3** Evolution of CH<sub>4</sub> fluxes in the three seasons for the two irrigation systems. **A** CF30 (continuous flooding applied 30 days after rice emergence (DAE)). **b** AWDI (alternate wetting and drying irrigation applied 30 DAE until panicle initiation when flooding was established). Points are average fluxes and error bars represent the standard error of six replicates. Dates of tillering, panicle initiation, flowering, drainage and harvesting are indicated as T, PI, F, D and H respectively



**Fig. 4** Soil redox potential (10 cm depth) over time for season 2012-13 for the two irrigation systems

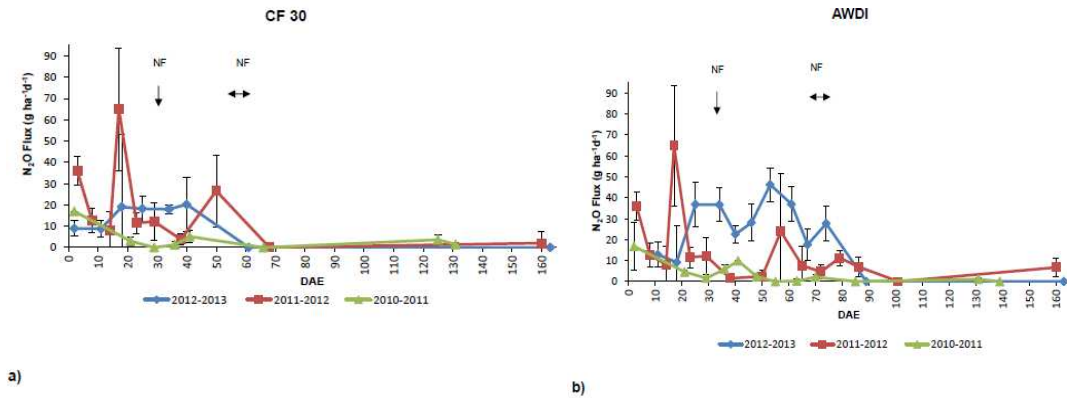
The CH<sub>4</sub> fluxes fluctuated and decreased gradually thereafter until harvest.

The seasonal CH<sub>4</sub> emission pattern exhibited increasing CH<sub>4</sub> rates consistent with water management, the development of plant growth and soil reduction. This pattern of emission with only one peak at the late reproductive stage, can be ascribed to the agronomical practice used which includes several factors. In the first place, the absence of organic amendment in our study which has been reported to enhance CH<sub>4</sub> emission (Watanabe et al. 1999; Itoh et al. 2011); inadequate conditions for anaerobic methanogenesis during the 30 day delayed flooding and finally non-flooded fallow conditions (Zhang et al. 2011) due to the regime of winter pastures, are possible explanations for the absence of an emission peak early in the cultivation season. At the flowering period, decaying tissues and root exudates which are ready sources of decomposable carbon are at a high level and well-developed gas transport systems in the plants (Wassmann et al. 2002), are factors that induce higher methane emissions at this plant mature stage (Mitra et al. 2005). In addition, suitable reduced conditions created by flooding the soil, promote the anaerobic degradation of organic matter present in soil and thus increases the availability of substrates for methanogenic archaea to produce CH<sub>4</sub> (Towprayoon et al. 2000). Alternate wet- dry conditions delayed the onset of methane emission as compared to continuously flooded plots. This pattern of a retarded initiation of methane emission has also been observed in mid-season and multiple drainage treatment (Towprayoon et al. 2005; Tyagi et al. 2010; Itoh et al. 2011). This decrease can be ascribed to temporary soil aeration generated due to partially drying of soil that in turn suppresses methanogenic activity and may increase aerobic methanotrophic activity. However, caution regarding its effectiveness in mitigating methane emissions has been described. Itoh et al. (2011) have hypothesized that in the absence of previous residue (rice straw), mid-season drainage can promote the growth of rice roots which provoke in turn, an increase in methane emission late in the cultivation season. In our study however, AWDI was effective in retarding and reducing total methane emission.

Fig. 5 a and b shows the pattern of N<sub>2</sub>O emission for both irrigation treatments in the three crop seasons. There was not a clear seasonal pattern of N<sub>2</sub>O emission, neither for the different seasons nor treatments. Till 30 days after rice emergency when CF30 was flooded, the two irrigation treatments behaved similarly and one or two peaks of

N<sub>2</sub>O fluxes were registered in all the seasons. These peaks of N<sub>2</sub>O fluxes prior to permanent flooding could not be correlated with rain events but the highest flux peaked after flushing in season 2011-2012 (65 g N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). According to other studies ( Khalil and Baggs 2005; Skiba and Ball 2002), this emission in wetter soils may be primarily due to denitrification.

In the AWDI irrigation system, N<sub>2</sub>O fluxes were detected until 90 days after rice emergence (DAE) while in CF30 only till 233 60 DAE. The dry-wet alternation created a favorable environment for both nitrification and denitrification processes (Zou et al. 2007) and probably enhanced soil available C released from organic matter and consequently denitrification activity that is mainly heterotrophic. N<sub>2</sub>O emission remained almost zero after 20 days past permanent flooding for both water management treatments. During this flooding period, when soils were waterlogged and had negative redox potential values, (Fig. 4), there were no N<sub>2</sub>O emissions, probably due to its further reduction to N<sub>2</sub> (Granli and Bockman 1994). Therefore, the period when N<sub>2</sub>O fluxes were registered was longer for the AWDI treatment while CH<sub>4</sub> on the contrary was emitted for a shorter lapse in AWDI than in CF30 (Figs. 3 and 5). Almost all N<sub>2</sub>O emissions occurred in the period of the rice cycle with no CH<sub>4</sub> emissions, before and till 20 days after flooding. However, N<sub>2</sub>O seasonal emissions were not significantly different for both treatments (Table 3). The sporadic behavior of N<sub>2</sub>O fluxes has been acknowledged previously in different agricultural soils including rice systems (Perdomo et al. 2007; Pittelkow et al. 2013; Zhao et al. 2011). Numerous factors are involved in controlling the N<sub>2</sub>O emission from soils, which contribute to the huge spatio-temporal variation in emissions in field trials As a consequence of the spatio-temporal variation, Bakken et al. (2012) stated that the power of statistical tests of such experiments is low. Linnquist et al (2012) surveyed publications reporting GHG emissions by cereals and reported that rice emitted an average of 0.88 kg N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> season<sup>-1</sup>. Our results were also on average around this value (0.6 for CF30 and 1.2 kg N<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> season<sup>-1</sup> for AWDI). They reported a 0.68% of the N applied to the crop was emitted as N<sub>2</sub>O. Considering the fertilization applied in this experiment (total 85 kg N ha<sup>-1</sup>) N<sub>2</sub>O emissions represent a 0.67% of the N applied.



**Fig. 5** Evolution of N<sub>2</sub>O fluxes in the three seasons for the two irrigation systems. **A** CF30 (continuous flooding applied 30 days after rice emergence (DAE)). **b** AWDI (alternate wetting and drying irrigation applied 30 DAE until panicle initiation when flooding was established). Points are average fluxes and error bars represent the standard error of six replicates. Dates of nitrogen fertilization are indicated as NF.

Soil moisture conditions and fertilizer management practices are the main factors that determine N<sub>2</sub>O emissions from paddy soils (Guo and Zhou 2007). However, in our experiment the peaks of N<sub>2</sub>O were not related to N- fertilizer application (Fig. 5a and b). Although excess fertilizer N doses result in high emissions, N<sub>2</sub>O emissions correlate poorly with the N fertilizer applied when they are within realistic ranges (Bakken et al. 2012). The demand-driven N supply minimizes the pool of excessive nitrogen in the soil and thus, reduces nitrous oxide emissions. At tillering the rice crop was actively growing and consequently the amount of soil mineral N left for losses was reduced. Total N-fertilizer recovery in rice plants was 40% when fertilizer was split versus a single dose application (20%) in the same rice field of this experiment (Irisarri et al. 2007). The split fertilization used in this study, which is the recommended method of application for this crop in Uruguay, probably increased the N use efficiency. An inverse relationship between N<sub>2</sub>O emission and N use efficiency has been previously clearly established (Dalal et al. 2003).

Table 3. Seasonal methane and nitrous oxide crop emissions and grain yield

Season	Treatment	Kg CH <sub>4</sub> .ha <sup>-1</sup> (1)	Kg N <sub>2</sub> O.ha <sup>-1</sup> (2)	Kg.ha <sup>-1</sup> grain yield
1	CF 30	208.2	0.3	11171
	AWDI	93.3	0.4	10170
2	CF 30	249.4 a	1.0	10387 a

	AWDI	106.3 b	1.2	8700 b
3	CF 30	248.8 a	0.6	9803
	AWDI	95.7 b	1.9	8992

(1)As interaction between season and treatment was significant, the analysis was performed by season and only means corresponding to the same season followed by different letters were significantly different at  $p < 0.05$

(2)Seasonal N<sub>2</sub>O emissions were not significantly different.

#### Water usage and water productivity

Table 4 shows variations in water usage and water productivity. No significant differences were observed between irrigation treatments on water usage in the first two seasons (seasons 1 and 2: 2010-2011 and 2011-2012). Significantly lower amounts of irrigation water were used in AWDI for season 3 (2012-2013). Season 3 required less amounts of irrigations during the period between planting and final flooding due to regular rainfall. To the contrary, season 1 was characterized by a shortage of rainy days during the above-mentioned period while the rainfall pattern in season 2 was of a more irregular nature, no rainfall after seeding followed by some days of rain. Water productivity is defined as the amount of water required per unit of grain yield. No significant differences in grain yield were observed between both treatments except in season 2 where CF30 recorded a higher yield (Table 3). On the other hand, irrigation water productivity was significantly higher under AWDI (2 kg m<sup>-3</sup>) in season 3 (Table 4) with an improvement of irrigation water use efficiency. Previous reports of different rice production systems in southeastern Asia, have indicated similar levels of savings of irrigation water with alternate water management strategies (Chapagain and Yamaji 2010; Thakur et al. 2011). Our results show that AWDI treatment can better profit from rainfall in a standard year (i.e. regular rainfall) increasing water productivity.

Table 4. Crop water consumption and productivity for the three seasons and the two irrigation systems evaluated.

Season	Treatment	Irrigation water applied (m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	Total water input (m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )*	Irrigation water productivity (Kg.m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )	Total water productivity (Kg.m <sup>3</sup> .ha <sup>-1</sup> )
1	CF 30	11208	15905	1.01	0.71
	AWDI	7708	12666	1.35	0.81
2	CF 30	8278	11657	1.23	0.82
	AWDI	7017	10667	1.25	0.87
3	CF 30	6072a	11103a	1.65a	0.88

	AWDI	4776b	10622b	2.00b	0.89
--	------	-------	--------	-------	------

\*Irrigation water applied + rainfall

<sup>(1)</sup>As interaction between season and treatment was significant, the analysis was performed by season and only means corresponding to the same season followed by different letters were significantly different at  $p < 0.05$

#### Global warming potential in relation to irrigation systems

When CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions are expressed as CO<sub>2</sub> equivalents, AWDI treatment lowered GWP values above 50% (Table 5). The major contributor to GWP in CF30 and AWDI was CH<sub>4</sub> which represented above 96 % and between 95 and 75 % of total GWP across years, respectively (Tables 3 and 5). This is in agreement with previous reports in paddy soils that have shown that N<sub>2</sub>O emissions are in terms of GWP-based CO<sub>2</sub> equivalents, much minor than those of CH<sub>4</sub> (Itoh et al. 2011; Pittelkow et al. 2013). Johnson Beebout et al. 2009, also stated that simultaneous minimization of both CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions cannot be maintained due to redox potential changes. In addition to the concern over CH<sub>4</sub> emissions from rice fields, rice productivity needs also to be considered. Uruguayan rice yields are among the highest in the world and any change in the water management strategy must make sure that this highly productive system is not negatively affected. As shown in Table 3, despite that only in season 2 AWDI rice yield was significantly lower in comparison to CF30, yield levels of this alternative irrigation system were always lower.

Table 5. Global Warming Potential (GWP) and Yield scaled GWP for the three seasons

Season	Treatment	GWP (Kg CO <sub>2</sub> eq. ha <sup>-1</sup> )	GWP reduction (%)	Yield scaled GWP (kg CO <sub>2</sub> eq. kg grain yield)	Yield scaled GWP reduction (%)
1	CF 30	5286		0.47	
	AWDI	2443	54	0.24	49
2	CF 30	6522		0.63	
	AWDI	3005	54	0.35	45
3	CF 30	6412		0.65	
	AWDI	2970	54	0.33	49

Yield-scaled GWP (Table 5) showed a reduction close to 50% for the alternative irrigation system vs. the traditional continuous flooding determining a potential treatment for rice GHG mitigation. In addition to the potential risk of having a yield



reduction associated with the AWDI treatment; the more complex and time consuming requirements to maintain soil water levels at the correct values during the alternate wetting and drying period and the fact that water is still mostly paid by area, determine the lack of adoption of this system in Uruguay. Therefore, some sort of incentives have to be established at the regional or country level in order for farmers to adopt this alternative irrigation strategy. These results are among the first to report GWP and yield-scaled GWP for two irrigation treatments in a dry-seeded, highly productive rice system and underpin the importance of water-management strategies to simultaneously achieve high yields, efficient water usage and contribute to global agricultural GHG mitigation. It can be concluded that controlled deficit irrigation can reduce GHG emissions and increase water productivity. However, this alternative irrigation method may compromise grain yield, mainly in dryer seasons. Therefore, the overall tradeoffs relationships between productivity, GWP emissions and water use should be assessed in order to stimulate farmers the adoptions of alternative irrigation systems.

#### **References**

- Bakken LR, Bergaust L, Liu B, Frostegård Å (2012) Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N<sub>2</sub>O emissions from soils. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367(1593): 1226–1234
- Blanco P, Roel A, Deambrosi E, Bonilla C, Cantou G, Molina F (2010) Closing the yield gap in rice production in Uruguay: impact of technological changes. <http://ricecongress.com/previous/extPdfs/OP02-4335-Blanco-edited.pdf>. Accessed 24 Febrero 2014
- Bowden RD, Melillo JM, Steudler PA, Aber JD (1990) Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the northeastern United States. *J Geophys Res* 95: 13997-14005
- Cai ZC, Xing GX, Yan XY, Xu H, Tsuruta H, Yagi K, Minami K (1997) Methane and nitrous oxide emissions from rice paddy fields as affected by nitrogen fertilizers and water management. *Plant Soil* 196:7–14
- Chapagain T, Yamaji E (2010) The effects of irrigation method, age of seedling and spacing on crop performance, productivity and water-wise rice production in Japan. *Paddy Water Environ* 8(1):81–90
- Cicerone RJ, Delwiche CC, Tyler SC, Zimmerman PR (1992) Methane emissions from California rice paddies with varied treatments. *Global Biogeochem Cycles* 6(3):233–248
- Conrad, R (2002) Control of microbial methane production in wetland rice fields. *Nutr Cycl Agroecosyst* 64: 59–69

- Dalal R C, Wang W, Robertson GP, Parton W (2003) Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Australian J Soil Res* 41: 165-195
- Deambrosi E (2003) The Uruguayan rice production system and its sustainability. In: *Proceedings of the 3rd International Temperate Rice Conference Punta del Este, Uruguay* p 19
- Freire Moterle D, Souza da Silva L, Moro VJ, Bayer C et al (2013) Methane efflux in rice paddy field under different irrigation managements. *R Bras Ci Solo* 37:431-437
- Garcia-Préachac F, Ernst O, Siri-Prieto G, Terra JA (2004) Integrating no-till into crop pasture rotations in Uruguay. *Soil Till Res* 77: 1-13
- Geymonat E, Ferrando L, Tarlera S (2011) *Methylogaea oryzae* gen .nov., sp. nov., a novel mesophilic methanotroph from a rice paddy field in Uruguay. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 2568 – 2572
- Granli T, Bøckman OC (1994) Nitrous oxide from agriculture. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences Supplement* 12: 7–128
- Guo J, Zhou C (2007) Greenhouse gas 378 emissions and mitigation measures in Chinese agroecosystems. *Agric Forest Meteorol* 142: 270–277
- Gutierrez J, Kim SY, Kim PJ (2013) Effect of rice cultivar on CH<sub>4</sub> emissions and productivity in Korean paddy soil. *Fields Crop Res* 146: 16-24
- Hadi A, Inubishi K, Yagi K (2010) Effect of water management on greenhouse gas emissions and microbial properties of paddy soils in Japan and Indonesia. *Paddy Water Environ* 8: 319-324
- Houghton JT et al (eds) (2001) *The scientific basis: contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* Climate Change, Cambridge University Press, pp 525–582
- IPCC (2007) *Climate change 2007—the physical science basis contribution of working group I to the fourth assessment report of the IPCC.* Cambridge University Press, New York
- Irisarri P, Gonnet S, Deambrosi E, Monza J (2007) Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 237-242
- Itoh M, Sudo S, Mori S, Saito H, Yoshida T, Shiratori Y, Suga S, Yoshikawa N, Suzue Y, Mizukami H, Mochida T, Yagi K (2011) Mitigation of methane emissions from paddy fields by prolonging midseason drainage. *Agric Ecosyst Environ* 141: 359–372
- Jacobson MZ (2005) *Atmospheric pollution: history, science and regulation.*

Cambridge University Press, New York

Jain N, Dubey R, Dubey DS, Singh J et al (2013) Mitigation of greenhouse gas emission with system of rice intensification in the Indo-Gangetic Plains. *Paddy Water Environ* doi:10.1007/s1033301303902

Johnson-Beebout SE, Angeles OR, Alberto MCR, Buresh, RJ (2009) Simultaneous minimization of nitrous oxide and methane emission from rice paddy soils is improbable due to redox potential changes with depth in a greenhouse experiment without plants. *Geoderma* 149: 45-53

Khalil MI, Baggs EM (2005) CH<sub>4</sub> oxidation and N<sub>2</sub>O emissions at varied soil water filled pore spaces and headspace CH<sub>4</sub> concentrations. *Soil Biol Biochem* 37: 1785-1794

Lindau CW, Bollich PK, Delaune RD, Patrick WH, Law, VJ (1991) Effect of urea fertilizer and environmental factors on CH<sub>4</sub> emissions from a Louisiana, USA rice field. *Plant Soil* 136: 195-203

Linquist B, Van Groenigen KJ, Adviento-Borbe MA, Pittelkow C , Van Kessel C (2012) An agronomic assessment of greenhouse gas emissions from major cereal crops. *Global Change Biol* 18: 194–209

Minamikawa K, Sakai N (2006) The practical use of water management based on soil redox potential for decreasing methane emissions from a paddy field in Japan *Agric Ecosyst Environ* 116: 181–188

Minamikawa K , Yagi K, Tokida T, Sander BO, Wassmann R (2012) Appropriate frequency and time of day to measure methane emissions from an irrigated rice paddy in Japan using the manual closed chamber method. *Greenhouse Gas Measurement and Management* 2: 118-128

Mitra S, Aulakh MS, Wassmann R, Olk DC (2005) Triggering of methane production in rice soils by root exudates: effects of soil properties and crop management *Soil Sci Soc Am J* 69: 563–570

Perdomo C, Irisarri P, Ernst O (2009) Nitrous oxide emissions from an uruguayan argiudoll under different tillage and rotation treatments *Nutr Cycl Agroecosyst* 84:119-128

Pittelkow CM, Adviento-Borbe MA, Hill J E, et al. (2013) Yield-scaled global warming potential of annual nitrous oxide and methane emissions from continuously flooded rice in response to nitrogen input *Agric Ecosyst Environ* 177: 10-20

Robertson GP, Paul EA, Harwood RR. 2000. Greenhouse gases in intensive agriculture: Contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289: 1922-1925.

Roel A, Firpo H, Plant RE (2007) Why do some farmers get higher yields?

Multivariate analysis of a group of Uruguayan rice farmers. *Computers and electronics in agriculture* 58: 78-92

Rogers CW, Brye KR, Norman RJ, Gasnier T, Frizzell D, Branson J (2012) Methane Emissions from a Silt-Loam Soil Under Direct-Seeded, Delayed-Flood Rice Management. In: Norman R J, Moldenhauer K A K (eds) University of Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series 600, Fayetteville, AR, pp 240-247

SAS Institute Inc. (2004) SAS/STAT® 9.1 User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC

Schultz H, Holzapel-Pschorn A, Conrad R, Rennenberg H, Seiler W (1989) A three year continuous record on the influence of daytime season and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy field. *Journal of Geophysical Research* 94: 16405-16416

Skiba U, Ball B (2002) The effect of soil texture and soil drainage on emissions of nitric oxide and nitrous oxide. *Soil Use Manage* 18: 56–60

Smith P, Martino D, Cai Z, Gwary D *et al.* (2007) Agriculture. In: Metz B, Davidson O R, Bosch P R, Dave R, Meyer L A (eds) *Climate Change: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, Cambridge University Press, pp 497-540

Thakur AK, Rath S, Patil DU, Kumar A (2011) Effects on rice plant morphology and physiology of water and associated management practices of the system of rice intensification and their implications for crop performance. *Paddy Water Environ* 9:13–24

Towprayoon S, Harvey NW, Jittasatra O, Kerdchuchean O (2000) Influence of rice variety and soil type on production and emission of methane from rice fields. *Asian Journal Energy Environ* 1:251–62

Towprayoon S, Smakgahn K, Poonkaew S (2005) Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. *Chemosphere* 59 (11):1547–56

Tyagi L, Kumari B, Singh S N (2010) Water management – A tool for methane mitigation from irrigated paddy fields. *Sci Total Env* 408:1085-1090

USDA (United States Department of Agriculture) (2010) *Keys to Soil Taxonomy*, 11th edn. USDA, USA 1–338

van Groenigen JW, Velthof GL, Oenema O, van Groenigen KJ, Van Kessel C (2010) Towards and agronomic assessment of N<sub>2</sub>O emissions: a case study for arable crops. *European Journal of Soil Science* 61: 909-913

Wassmann R, Aulakh MS, Lantin R S, Rennenberg H, Aduna J B (2002) Methane emission patterns for rice fields planted to several cultivars for nine seasons. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 64: 111–124

Watanabe A, Takeda T, Kimura M (1999) Evaluation of origins of CH<sub>4</sub> carbon emitted from rice paddies. *Journal of Geophysical Research* 104 (D19): 23623–23629

Xu SR, Jaffe P, Mauzerall DL (2007) A process-based model for methane emission from flooded rice paddy systems. *Ecol Model* 205(3–4):475–91

Yagi K, Tsuruta H, Minami K (1997) Possible options for mitigating methane emission from rice cultivation. *Nutr Cycl Agroecosyst* 49: 213–220

Yan X, Yagi K, Akiyama H, Akimoto H, (2005) Statistical analysis of the major variables controlling methane emission from rice fields. *Global Change Biol.* 11: 1131–1141

Zhang G, Zhang X, Ma J, Xu H, Cai Z (2011) Effect of drainage in the fallow season on reduction of CH<sub>4</sub> production and emission from permanently flooded rice fields. *Nutr Cycl Agroecosyst* 89: 81–91

Zhao X, Min J, Wang S, Shi W, Xing G (2011) Further understanding of nitrous oxide emission from paddy fields under rice/wheat rotation in south China. *Journal of Geophysical Research* 116: G02016

Zou J, Huang Y, Jiang J, Zheng X, Sass R L (2005) A 3 year field measurement of methane and nitrous oxide emissions from rice paddies in China: effects of water regime, crop residue, and fertilizer application. *Global Biogeochem. Cycles* 19, GB2021

Zou J, Huang Y, Zheng X, Wang Y (2007) Quantifying direct N<sub>2</sub>O emissions in paddy fields during rice growing season in mainland China: dependence on water regime. *Atmos Environ* 41: 8030–8042