

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN: EFECTO DEL
CULTIVAR DE ARROZ Y EL TIPO DE SUELO**

por

Gabriela ILLARZE DIVE

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de *Magister* en Ciencias
Agrarias opción Ciencias
Vegetales**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
(Setiembre) 2016**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dra. Silvana Tarlera, Ing. Agr. PhD. Amabelia Del Pino, e Ing. Agr. PhD. José Terra, el 30 de Setiembre de 2016.
Autora: Lic. Gabriela Illarze. Directora Dra. Pilar Irisarri.

AGRADECIMIENTOS

A Pilar, por sus enseñanzas, dedicación y motivación. Por brindarme la posibilidad de crecer en lo profesional y en lo personal.

A mis compañeros Germán, Gastón, Andrea y Pamela con quienes comparto el día a día y me brindan su amistad.

A la familia y amigos que, con su cariño y consejos, me apoyan en este transcurso de la vida.

A los estudiantes que colaboraron en las actividades de laboratorio: Guillermo Gordillo, Alfonso Errecarte, Mariano Blanco, María Eugenia Salvat y Pamela Gutiérrez.

A Amabelia del Pino y Silvana Tarlera por brindarme su conocimiento y asesoría en el transcurso académico del posgrado.

Al grupo de investigación del Laboratorio de Bioingeniería Matemática de la Facultad de Ingeniería, dónde concentré los exudados radicales de las plantas mediante rotoevaporación.

A los investigadores del laboratorio de Poscosecha: Fernanda Zaccari, Ana Cecilia Silveria y Giovanni Galietta por su colaboración y asesoría en la concentración de los exudados radicales de las plantas mediante liofilización.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) – Laboratorio de Forrajes tropicales, dónde realicé el bioensayo de bioluminiscencia de inhibición de la nitrificación, bajo la tutoría de Jacobo Arango y Jonathan Nuñez. Agradezco también a Ashly Lisset, María Recio y Eliana González y muy especialmente a Alba Lucía Chávez, no solo por su gran aporte en lo académico, sino por su hospitalidad, el cariño y los consejos brindados.

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) – Departamento de bioquímica y genómica microbiana- Unidad de microbiología molecular, dónde realicé una pasantía bajo la tutoría de Gastón Azziz, para determinar la abundancia de bacterias y arqueas oxidantes de amonio por la técnica de PCR en tiempo real.

Al grupo de Ecología Microbiana de la Facultad de Química, dónde realicé una pasantía bajo la tutoría de Lucía Ferrando, para determinar la abundancia de bacterias oxidantes del amonio por la técnica de PCR en tiempo real.

A la Ing. Agr. Sara Riccetto del INIA Treinta y Tres por su colaboración en la toma de gases y muestras de suelo del ensayo a campo en la estación experimental Paso de la Laguna.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica por financiar el proyecto de iniciación a la investigación “Efecto del cultivar de arroz sobre la nitrificación y desnitrificación del suelo”.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por financiarme la beca de posgrado.

Al grupo CSIC “Biogeoquímica bacteriana en suelos agrícolas” por financiar la pasantía al CIAT – Colombia.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. EL ÓXIDO NITROSO.....	1
1.1.1 <u>Emisiones microbianas de óxido nitroso</u>	1
1.2. EMISIÓN DE ÓXIDO NITROSO EN EL CULTIVO DE ARROZ.....	4
1.2.1 <u>Emisiones de GEI en arrozales uruguayos</u>	6
1.2.2 <u>Suelos dónde se cultiva arroz en Uruguay</u>	7
1.3 ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE GEI EN ARROZALES	8
1.3.1 <u>Inhibición biológica de la nitrificación</u>	9
1.3.1.1 Métodos para cuantificar la BNI.....	10
1.4. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	12
1.5. HIPÓTESIS.....	12
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
2.1. EMISIÓN DE N ₂ O, MINERALIZACIÓN, NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN EN DOS ARROZALES DE URUGUAY	13
2.1.1. <u>Sitios de experimentación y manejo del cultivo</u>	13
2.1.2. <u>Medidas de óxido nitroso</u>	14
2.1.3. <u>Actividades potenciales microbianas</u>	16
2.1.3.1. Actividad potencial de mineralización de nitrógeno	16
2.1.3.2. Actividad potencial de oxidación de amonio.....	16
2.1.3.3. Actividad potencial de desnitrificación	16
2.1.4. <u>Recuento de microorganismos</u>	17
2.1.5. <u>Cuantificación del nitrógeno mineral</u>	17
2.2. ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARROZ.....	18
2.2.1. <u>Obtención de compuestos BNI de arroz</u>	18
2.2.1.1. A partir de exudados radicales de arroz.....	18
2.2.1.2. A partir de extracto de raíces de arroz	19

2.2.2. <u>Bioensayo de inhibición de la nitrificación</u>	20
2.3. ESTIMACIÓN DE LA INHIBICIÓN	
DE LA NITRIFICACIÓN EN SUELOS	21
2.3.1. <u>Experimento 1</u>	21
2.3.2. <u>Experimento 2</u>	22
2.3.3. <u>Cuantificación de arqueas y bacterias oxidantes del amonio</u>	23
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	24
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	25
3.1. EMISIÓN DE N ₂ O, MINERALIZACIÓN, NITRIFICACIÓN Y	
DESNITRIFICACIÓN EN DOS ARROZALES DE URUGUAY	25
3.1.1 <u>Flujos de N₂O</u>	25
3.1.2 <u>Mineralización neta</u>	28
3.1.3 <u>Oxidación de amonio</u>	32
3.1.4 <u>Desnitrificación</u>	35
3.2. POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN DE CULTIVARES	
DE ARROZ.....	37
3.3. INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN SOBRE EL SUELO.....	41
3.3.1 <u>Cuantificación de arqueas y bacterias nitrificantes del suelo</u>	50
4. <u>CONCLUSIONES</u>	56
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	58
6. <u>ANEXOS</u>	77

RESUMEN

El cultivo de arroz es una fuente importante de CH₄ pero también de N₂O. El N₂O en el suelo tiene su origen principal en los procesos microbianos de nitrificación y desnitrificación. Tanto la actividad, diversidad y cantidad de los grupos microbianos responsables de estos procesos en un suelo bajo arroz cambian a lo largo del cultivo en respuesta a las condiciones del suelo, exudación de las raíces e inundación. Las principales zonas de cultivo de arroz están en el este y norte del país. Estas zonas presentan tipos de suelos diferentes en su contenido de materia orgánica, entre otras características. Recientemente se comunicó la primera evidencia de inhibición biológica de la nitrificación (BNI) por exudados radicales de arroz que variaba con el cultivar. Los objetivos de este trabajo fueron: (1) estudiar las actividades y número de desnitrificantes y oxidantes de amonio, la mineralización de N y la emisión de N₂O en arrozales del este y del norte, (2) comprobar y comparar el potencial BNI de exudados radicales de dos cultivares de arroz, El Paso 144 e INIA Tacuarí y (3) evaluar su efecto inhibitorio sobre la actividad y abundancia de arqueas y bacterias oxidantes de amonio en esos suelos. Al comparar la emisión con campanas estáticas, se observó un mayor flujo de N₂O en el suelo del norte (Salto) a la madurez del arroz y posteriormente al drenado. El potencial de mineralización de N aumentó a lo largo del ciclo del cultivo así como el número de desnitrificantes y este correlacionó con la emisión de N₂O. El suelo del norte tuvo mayor actividad y número de desnitrificantes. La correlación entre la emisión de N₂O y el número de desnitrificantes podría usarse para modelar los flujos de este gas.

En el bioensayo con una cepa recombinante de *N. europaea* se comprobó efecto BNI de los exudados radicales de los dos cultivares de arroz. Tacuarí presentó mayor inhibición y en un ensayo con microcosmos la BNI fue mayor a la producida por el inhibidor sintético DCD en el suelo del este. El número de copias del gen *amoA* de arqueas no varió con el agregado de exudados. La capacidad BNI de estos cultivares debe confirmarse en el campo y constituiría una aproximación interesante a la mitigación de la emisión de N₂O.

Palabras clave: óxido nitroso, arrozal, inhibición biológica de la nitrificación, *amoA*

NITRIFICATION AND DENITRIFICATION: EFFECT OF RICE CULTIVAR AND SOIL TYPE

SUMMARY

Rice crop is an important source of CH₄ but also of N₂O. N₂O in soils is originated mainly by the microbial processes of nitrification and/or denitrification. The activity, diversity and size of the microbial groups responsible of these processes in a soil cultivated with rice change along the crop cycle according to soil conditions, roots exudation and flooding. Rice is cultured primarily in Uruguay's East and North zones. These zones present soil types that differ in their organic matter content, among other characteristics. Recently the first evidence of biological nitrification inhibition (BNI) by rice root exudates was reported and it varied with the cultivar. The objectives of this work were: (1) to study the activities and number of denitrifiers and NH₄⁺ oxidizers, N mineralization and N₂O emission in soils from East and North, (2) to check and compare the BNI potential of the rice exudates of two rice cultivars, El Paso 144 and INIA Tacuarí, and (3) to evaluate their inhibitory effect on the activity and abundance of bacteria and archaea NH₄⁺ oxidizers in both soils. When comparing emissions with static chambers, those from Northern soil had a higher N₂O flux at rice maturity after drainage. N mineralization potential and denitrifiers' number increased along the crop cycle, correlating with N₂O emission. The Northern soil had higher activity and number of denitrifiers. Correlation among N₂O emission and denitrifiers number may be used to model this gas fluxes.

In the bioassay with a recombinant strain of *N. europaea* the BNI effect of both cultivars was verified. Tacuarí presented higher inhibition potential and in microcosms the BNI effect was higher than the produced by the synthetic inhibitor DCD with soil from the East. The *amoA* copy number of archaea was not affected by the exudates addition. These cultivars BNI ability should be checked in the field and will be interesting as a N₂O emission mitigation strategy.

Keywords: nitrous oxide, ricefield, biological nitrification inhibition, *amoA*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ÓXIDO NITROSO

El óxido nitroso (N_2O) es un potente gas de efecto invernadero (GEI) con un potencial de calentamiento 298 veces mayor al del CO_2 y 13,5 veces mayor al del CH_4 (IPCC 2007). Además, este gas se considera muy importante en la destrucción de la capa de ozono estratosférica (Ravishankara et al. 2009) y tiene una vida media de 114 años, por lo cual su producción tendrá influencia varias generaciones después (IPCC 2007, Crutzen 1981). La agricultura es una fuente importante de N_2O , asociada a la mayor aplicación de fertilizantes. Se estima que el 1,3-2,5% del nitrógeno aplicado como fertilizante se emite como N_2O (IPCC 2006, Giles 2005) y se prevé un aumento del 35-60% para el 2030 (Liu et al. 2010). Por esta razón, la contribución de la agricultura al calentamiento global es cada vez más preocupante y requiere acciones políticas para la mitigación de los GEI (IPCC 2014).

1.1.1 Emisiones microbianas de óxido nitroso

La principal fuente de N_2O en el suelo son los procesos microbianos de desnitrificación y/o nitrificación (Conrad 1996). Estos procesos contribuyen aproximadamente con el 70% del N_2O producido anualmente en todo el mundo (Mosier 1998). La nitrificación es un proceso aerobio pero cuando la provisión de oxígeno es limitada se genera N_2O como subproducto, mientras que la desnitrificación se activa una vez que el O_2 ha sido consumido generando microambientes anóxicos dentro del perfil del suelo (Smith et al. 2003). Sin embargo, estos dos procesos pueden ocurrir de forma simultánea en agregados del suelo (micrositios), debido al gradiente espacial de O_2 producido (Stevens et al. 1997).

El proceso de nitrificación por el que el amonio (NH_4^+) es convertido en nitrato (NO_3^-) es un proceso clave en el suelo. Cuando la nitrificación ocurre rápidamente, puede superar la demanda de la planta por NO_3^- y este se pierde por lavado o desnitrificación. Esas pérdidas pueden llegar en el cultivo de arroz hasta el 60% del

N agregado (Irisarri et al. 2007) y además de la pérdida económica que representan, pueden causar varios problemas ambientales, por contaminación del aire y cuerpos de agua (Davidson et al. 2012). En forma general, la nitrificación es un proceso en dos pasos, el primero de ellos es la oxidación de NH_4^+ a nitrito (NO_2^-) y subsecuentemente la oxidación a NO_3^- . El primer paso es catalizado por la amonio monooxigenasa (AMO), donde el NH_4^+ es oxidado a hidroxilamina (NH_2OH) con la reducción de O_2 . A continuación, la NH_2OH es oxidada a NO_2^- por la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). Se pensaba que este proceso era llevado a cabo exclusivamente por bacterias quimiolitautótrofas. Sin embargo, el proceso es más complejo e involucra también a arqueas nitrificantes autótrofas, nitrificantes heterótrofos y bacterias *anammox* y *comammox* (van Groenigen et al. 2015, Norton y Stark 2011, Anexo 2). Existe evidencia que indica que las arqueas oxidantes del amonio (AOA) tienen gran potencial de nitrificación, ya que superan en número y tienen mayor actividad que las bacterias oxidantes del amonio (AOB) en ciertos ecosistemas (Verhamme et al. 2011, Zhang et al. 2012, Di et al. 2010, Gubry-Rangin et al. 2010).

Los microorganismos nitrificantes producen N_2O por nitrificación y por desnitrificación nitrificante. En la nitrificación el N_2O se produce como subproducto durante la oxidación de NH_4^+ por la descomposición espontánea de NH_2OH o NO_2^- (Anexo 2). Este mecanismo abiótico sería la vía principal de emisión de N_2O por AOA, ya que hasta el momento no existe evidencia fisiológica o enzimática que apoye otra forma de emisión (Hink et al. 2016). Las AOB también pueden producir N_2O de forma biótica a través de la desnitrificación nitrificante, por la reducción de NO_2^- a N_2O y N_2 (Anexo 2). Se conoce poco de este último proceso. Se cree que es un proceso energéticamente favorable en condiciones limitantes de O_2 o sería una respuesta para detoxificar el NO_2^- (van Groenigen et al. 2015). Algunas investigaciones han reportado que hasta el 30% del N_2O producido por un suelo se debe a la nitrificación desnitrificante (Webster y Hopkins 1996) y recientemente se confirmó que este es el proceso dominante en la producción N_2O derivado de la fertilización con NH_4^+ a una concentración de O_2 menor al 5% (Zhu et al. 2013). De forma contraria, las AOA producen más N_2O cuando el NH_4^+ proviene de la

mineralización del suelo, aunque en menor proporción que el emitido por AOB (Hink et al. 2016).

La desnitrificación es un proceso respiratorio que utiliza el NO_3^- o NO_2^- como aceptor final de electrones en ausencia de O_2 . Los microorganismos que llevan a cabo dicho proceso son principalmente heterótrofos y anaerobios facultativos. Este proceso está ampliamente distribuido entre los diferentes taxones, se conocen más de 60 géneros de microorganismos desnitrificantes, que incluyen arqueas y hongos.

El proceso de desnitrificación produce pérdidas de N del suelo ya que se generan intermediarios gaseosos como NO, N_2O y N_2 (Groffman 2012). Es llevado a cabo en etapas sucesivas por distintas enzimas reductasas (Anexo 2). El primer paso, la conversión de NO_3^- a NO_2^- , es catalizado por la nitrato reductasa que puede ser periplasmática o de membrana, codificada por los genes *napA* y *narG*, respectivamente. En la reducción de NO_2^- a NO interviene la nitrito reductasa. Existen dos variantes de esta enzima, una citocromo cd1, codificada por el gen *nirS*, y una enzima dependiente de Cu, codificada por *nirK*. Las dos versiones de esta enzima se consideraban excluyentes (Zumft 1997), sin embargo, recientemente Graf et al. (2014) encontraron ambos genes en varios microorganismos, aunque se desconoce si ambos son funcionales simultáneamente. Estos representan genes funcionales exclusivos para desnitrificantes, por lo que son muy utilizados en ensayos de diversidad (Enwall et al. 2010). La reducción de NO a N_2O es llevada a cabo por la óxido nítrico reductasa, codificada por los genes *norB* y *norC*. Finalmente, el N_2O es reducido a N_2 por la óxido nitroso reductasa, codificada por el gen *nosZ*. De esta forma, se cierra el ciclo del N, ya que el N_2 puede reentrar al sistema terrestre a través de la fijación de N_2 de la atmósfera. Sin embargo no todos los microorganismos capaces de desnitrificar tienen toda la vía enzimática hasta N_2 y en caso de tenerla, su expresión depende en gran medida de la cantidad de O_2 disponible (Jones 2010, Zumft 1997). Se han descrito bacterias que poseen el gen *nosZ* y carecen del resto de los genes de desnitrificación (Zumft 1997) y recientemente se identificó un *nosZ* atípico en microorganismos con un importante rol como consumidores de N_2O (Jones et al. 2014, Sanford et al. 2012). Por otra

parte, existen desnitrificantes que carecen del gen *nosZ* y producen N_2O como producto final (Jones et al. 2008).

1.2. EMISIÓN DE ÓXIDO NITROSO EN EL CULTIVO DE ARROZ

El cultivo de arroz irrigado es considerado una fuente importante de metano fundamentalmente y de N_2O (revisado por Irisarri y Perdomo, 2009). De la agricultura global, los arrozales contribuyen con un 30 % a la emisión de CH_4 y un 11% a la emisión de N_2O (IPPC 2007).

La emisión de N_2O en arrozales ocurre principalmente durante los períodos de alternancia de inundación y secado del cultivo (Dobermann y Witt 2000). Bajo estas condiciones de manejo del agua se establecen en el suelo zonas reductoras moderadas, que favorecen la emisión de N_2O por parte de los microorganismos desnitrificantes y nitrificantes, ya que cuando los arrozales permanecen inundados, en condiciones anaerobias, el N_2O continúa su reducción hasta nitrógeno molecular (N_2) (Granli y Bøckman 1994). A su vez, una vez establecida la inundación se diferencian zonas con distintos potenciales redox (Figura 1). En la zona oxidada, la liberación de O_2 por las raíces contribuye con la nitrificación y subsecuentemente con la desnitrificación luego de la difusión de NO_3^- a la zona reducida del suelo (Xing et al. 2009). Este acople entre la nitrificación y la desnitrificación sugiere una pérdida significativa de N en suelos bajo el cultivo de arroz. Se han registrado pérdidas de más de 40% del nitrógeno agregado al cultivo (De Datta y Buresh 1989, Galbally et al. 1987). Por otra parte, la mineralización de N de la materia orgánica (MO) del suelo, proceso que consiste en la transformación de N orgánico a formas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+), es clave en el suelo no solo para la provisión de este nutriente al cultivo de arroz, sino también porque deja disponible cantidades de NH_4^+ en el suelo que pueden perderse previa nitrificación (Yeasmin et al. 2012, Subbarao et al. 2006a).

La desnitrificación no solo ocurre en la zona cultivada, también se ha demostrado que existe desnitrificación a nivel subterráneo del suelo bajo saturación (Figura 1) (Xing et al. 2002). Las plantas de arroz también pueden colaborar en la emisión de

GEI por la liberación de gases retenidos en el suelo a través del aerénquima, un tejido especializado desarrollado en el cultivo inundado que permite tanto la entrada como el escape de gases (Le Mer y Roger 2001).

Por lo tanto, la heterogeneidad espacial y temporal en el cultivo de arroz son factores determinantes de la actividad desnitrificante y nitrificante del suelo. Se ha señalado que los mayores flujos de N_2O producidos por desnitrificación ocurren en pequeñas zonas (*hotspots*) y en momentos puntuales (*hot moments*) (van Groenigen et al. 2015, Groffman et al. 2009) asociado a los cambios en la humedad del suelo (ya que determina la disponibilidad de O_2), la disponibilidad de carbono (C), el pH, la concentración de NO_3^- y la temperatura (Jones 2010).

Se sabe que los suelos cultivados con arroz tienen actividad desnitrificante alta, sin embargo los microorganismos responsables de la misma no han sido demasiado estudiados (Ishii et al. 2009). Yoshida et al. (2009) han comunicado que tanto la diversidad como la cantidad de desnitrificantes en un suelo bajo arroz cambian a lo largo del cultivo en respuesta a las condiciones del suelo y a la inundación. Estos suelos también son considerados uno de los principales hábitats de las AOB (Nicolaisen et al. 2004) y la mayor relación de AOA con respecto a AOB encontrada en varios suelos cultivados con arroz también indicaría que estas tienen alto potencial de nitrificación en este ecosistema (Chen et al. 2010, Chen et al. 2008).

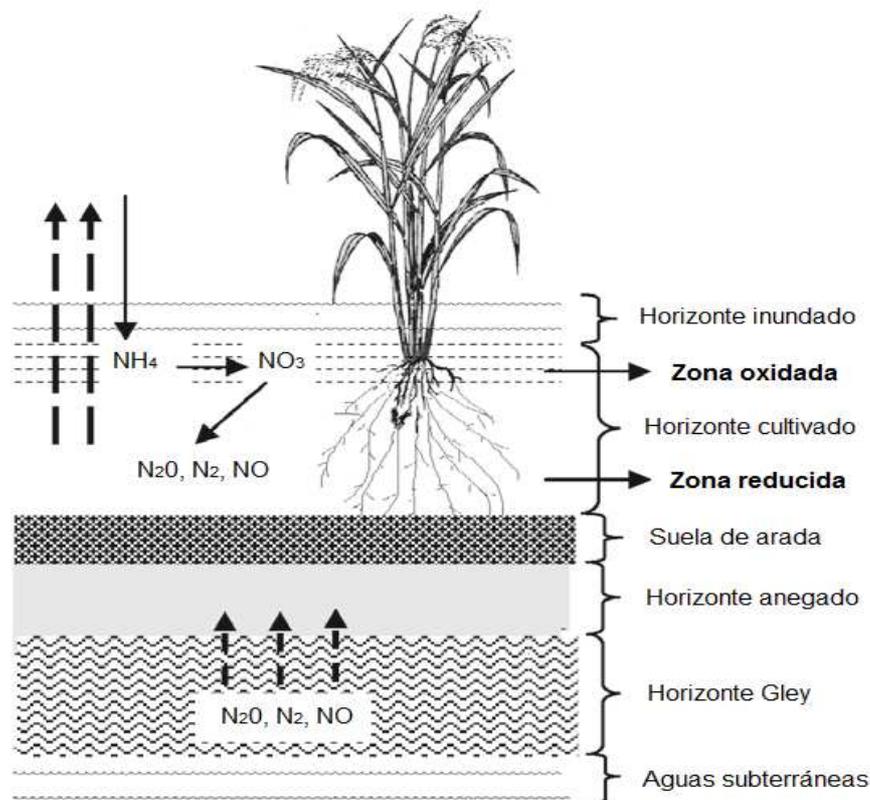


Figura 1. Emisión de óxido nitroso (N_2O) en zonas del suelo y en la interfase suelo - agua del cultivo de arroz irrigado (Modificado de Xing et al. 2009).

1.2.1 Emisiones de GEI en arrozales uruguayos

El cultivo de arroz ocupa aproximadamente 175.000 ha en Uruguay (ACA 2015), se siembra en secano en el mes de octubre, con eventuales baños o riegos rápidos y se inunda unos 30 a 35 días luego de la emergencia, al inicio del estadio de macollaje del cultivo (Pittelkow et al. 2016). Finalmente, se drena 20 días antes de la cosecha. Estas prácticas agronómicas que inducen cambios temporales y espaciales en las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis del suelo (Yu y Patrick 2004, Bronson et al. 1997) junto a las variaciones en las características de los suelos, tales como pH, materia orgánica, disponibilidad de nutrientes y la actividad microbiana durante todo el ciclo del cultivo, proveen un ambiente único para la producción de N_2O (Yu y Patrick 2004, Hou et al. 2000).

Mediciones realizadas en un arrozal del este uruguayo comprobaron que la máxima emisión de N_2O se produce luego de la aplicación de urea e inundación del cultivo, al inicio del macollaje. En general, las emisiones de CH_4 y N_2O mostraron tendencias opuestas a lo largo del ciclo del cultivo. Mientras la emisión de CH_4 comenzó luego de establecida la inundación y asegurado un ambiente reductor que permita el crecimiento de las bacterias metanogénicas, no se observó más emisión de N_2O después de dos semanas de inundado el cultivo (Tarlera et al. 2009). También se detectaron emisiones de N_2O luego de la aplicación de baños al cultivo y luego del retiro de agua previo a la cosecha (Irisarri et al. 2012), si bien los momentos de mayor emisión de N_2O en el arrozal ocurrieron en seguida de la fertilización e inundación del cultivo y resultaron casi inexistentes durante la fase inundada del cultivo (Tarlera et al. 2016, Irisarri et al. 2012).

1.2.2 Suelos dónde se cultiva arroz en Uruguay

Las propiedades de los suelos son determinantes en la producción y emisión de GEI (Yu et al. 2004). Xiong et al. (2007) demostraron que el tipo de suelo afecta significativamente la emisión de N_2O y CH_4 . Un suelo con mayor proporción de C orgánico y N mostró mayor tasa de emisión de CH_4 bajo inundación.

Los procesos microbianos productores de GEI también dependen directamente de las condiciones físicas del suelo, ya que la estructura y humedad de un suelo afectan el potencial redox y por tanto el balance entre nitrificación y desnitrificación del suelo (Smith et al. 2003). Se sabe que la actividad desnitrificante se correlaciona positivamente con la MO soluble (Henry et al. 2008).

En el Uruguay el arroz se cultiva en 12 Departamentos, las mayores áreas en los Departamentos de Treinta y Tres, Cerro Largo, Artigas y Rocha (ACA 2015). En el este del país la mayor parte de la producción se realiza sobre suelos de zonas bajas de la cuenca de la Laguna Merín, caracterizados por presentar una gran diferenciación textural, con un horizonte subsuperficial pesado y un horizonte superficial de textura media o incluso liviana. En el norte en cambio, si bien también se realiza la producción en zonas bajas, es frecuente que se trate de laderas de mayor pendiente. Los suelos predominantes son desarrollados sobre materiales derivados del basalto,

los cuales tienen en general textura pesada y menor diferenciación textural que los anteriores. La mayor pendiente hace que estos suelos tengan un mejor drenaje y no muestren una tendencia tan clara al anegamiento durante el período no inundado como los anteriores. También los suelos desarrollados sobre basalto difieren de los del este en otra serie de características tales como, mayor contenido de MO y de bases intercambiables, y abundancia de óxidos de Fe que promueven la retrogradación de P (Hernández y Berger 2003). Por lo que estos suelos podrían diferir en la dinámica de las poblaciones y la actividad potencial de nitrificantes y desnitrificantes, así como en las formas minerales del N presentes en el suelo.

1.3 ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE GEI EN ARROZALES

Entre las estrategias de mitigación de emisión de GEI para el arroz se sugiere: modificar el manejo del agua del cultivo, realizar menos laboreo del suelo, reducir el agregado de abonos orgánicos y de fertilizantes, seleccionar cultivares con menores tasas de emisión y la rotación con otros cultivos (Hussain et al. 2014).

Entre las estrategias de mitigación de las emisiones de CH₄ sugeridas para el arroz en Uruguay, surgen como las más prometedoras, el drenaje de la chacra cuando el cultivo está en etapa reproductiva y el empleo de cultivares de arroz con menores tasas de emisión. Como el drenaje de la chacra parece inviable a nivel comercial en Uruguay y podría aumentar la emisión de N₂O en algunos años (Tarlera et al., 2016), un cultivar de arroz con bajo transporte de gases, escasa producción de exudados radicales y alto índice de cosecha sería preferible desde el punto de vista de la emisión de GEI.

A través de la exudación de las raíces, las plantas pueden proveer compuestos orgánicos que constituyen una fuente de C y energía disponible, capaz de aumentar la actividad, diversidad y abundancia microbiana en la zona rizosférica (Shi et al. 2011, Henry et al. 2008). Asimismo, la desnitrificación es controlada por la planta, a través de la asimilación de NO₃⁻, la respiración y la exudación de las raíces (revisado por Philippot y Hallin 2011). Bajas concentraciones de O₂ y alta disponibilidad de

fuentes de energía por la exudación radical son necesarios para estimular la actividad desnitrificante en la rizósfera (Henry et al. 2008, Mounier et al. 2004).

La complejidad y cantidad de los exudados radicales varía considerablemente por factores endógenos como el cultivar y exógenos como la respuesta a diferentes estreses ambientales. En arroz, varios estudios reportan variación en la composición y contenido de exudados radicales de acuerdo al cultivar de arroz y el estadio de desarrollo de la planta (Baudoin et al. 2003). Hardoim et al. (2011) estudiaron las comunidades microbianas asociadas a las raíces de plantas de arroz de diez cultivares y demostraron que el genotipo de la planta determina la composición de la comunidades bacterianas asociadas. El estudio de los cultivares de arroz y sus exudados ha sido encarado mayoritariamente respecto a la emisión de CH_4 (Aulakh et al. 2001), pero no a la de N_2O . Sin embargo, un nuevo enfoque para mitigar la emisión de N_2O demostró que existen plantas capaces de inhibir la nitrificación en el suelo a través de la liberación de moléculas por sus exudados radicales (Subbarao et al. 2015) y estudios recientes mostraron la primera evidencia de inhibición de la nitrificación por exudados radicales de arroz que variaba con el cultivar (Sun et al. 2016, Tanaka et al. 2010).

Si bien existen inhibidores sintéticos de la nitrificación cuyo uso se ha recomendado para disminuir las emisiones de N_2O tanto provenientes de la nitrificación como de la desnitrificación, sus costos son altos y su eficiencia depende de las condiciones locales (Zerulla et al. 2001).

1.3.1 Inhibición biológica de la nitrificación

La inhibición biológica de la nitrificación (BNI) se refiere a la habilidad de ciertas plantas de producir y exudar compuestos inhibidores de la nitrificación por sus raíces (Subbarao et al. 2006b). Esta propiedad vegetal representa una mejora en el uso eficiente del nitrógeno con un gran potencial para favorecer la agricultura y disminuir la emisión de N_2O , ya que al limitar la nitrificación se minimiza la pérdida de N como NO_3^- y permanece en forma de NH_4^+ (Subbarao et al. 2013a).

Algunos forrajes tropicales y ciertos cultivos han mostrado un amplio rango de actividad BNI en sus raíces. El forraje tropical *Brachiaria humidicola* presenta la actividad BNI más alta identificada hasta el momento (Subbarao et al. 2006b). Entre los cereales que se han evaluado, el sorgo y el arroz presentan actividad BNI (Tanaka et al. 2010, Zakir et al. 2008), mientras que el maíz, trigo y la cebada no presentan actividad BNI en las primeras evaluaciones (Subbarao et al. 2007a). Por otro lado, las leguminosas que se han analizado estimulan la nitrificación por lo que no tienen capacidad BNI (Subbarao et al. 2007a).

La actividad BNI es afectada por múltiples factores presentes en el suelo y en la planta. Se ha visto que varía con el suelo y la edad de la planta, entre otros factores (Subbarao et al. 2012). Una molécula sintetizada por las raíces de *B. humidicola*, denominada brachiolactona, resultó ser la responsable de la inhibición (Subbarao et al. 2009). En sorgo se identificaron las moléculas sorgolenona, sacuranetina y metil 3-(4-hidroxifenil) propionato (MHPP) (Subbarao et al. 2013b) y recientemente en arroz se identificó la molécula 1,9-decanediol (Sun et al. 2016). Todos estos compuestos bloquean la AMO y en algunos casos también la HAO y no afectan a otros microorganismos presentes en el suelo (Gopalakrishnan et al. 2009), lo que representa una ventaja dado el ataque dirigido para disminuir la nitrificación en el suelo.

Dada la importancia de los procesos de nitrificación y desnitrificación en las pérdidas de N en un suelo inundado bajo arroz, la capacidad BNI encontrada en este cultivo, podría representar una ventaja en la mejora del uso eficiente del N por el cultivo y cómo estrategia de mitigación de la emisión de N₂O.

1.3.1.1 Métodos para cuantificar la BNI

El método para caracterizar la actividad BNI en las diferentes especies reportadas ha sido el bioensayo de luminiscencia, modificado por Subbarao et al. (2006b). Inicialmente este bioensayo se había propuesto para evaluar el efecto de inhibidores sintéticos de la nitrificación en aguas residuales (Iizumi et al. 1998), pero actualmente se considera una herramienta útil en la medición de la actividad BNI de

especies vegetales. El ensayo consiste en el uso de una cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea* que porta el gen de la luciferasa (*luxAB*) y resistencia a kanamicina. Esta cepa produce bioluminiscencia en condiciones normales que se reduce en presencia de inhibidores de la nitrificación que inactivan la amonio monooxigenasa, por lo que existe una correlación altamente significativa entre la inhibición de la luminscencia y la inhibición de la producción de NO_3^- (Subbarao et al. 2006b).

Por otro lado, se han propuesto ensayos de incubación de suelos (microcosmos) para evaluar la actividad BNI de una planta, a través del seguimiento del sustrato y producto de la nitrificación y establecer las tasas de nitrificación en el tiempo (Ghoneim et al. 2014, Tanaka et al. 2010, Subbarao et al. 2009, Zakir et al. 2008). De forma complementaria, varios estudios reportan para probar este efecto, la cuantificación de las poblaciones de AOA y AOB a través del método de PCR en tiempo real (Arango et al. 2014, Subbarao et al. 2009). El marcador funcional de estas poblaciones es el gen *amoA* que codifica para una de las subunidades de la amonio monooxigenasa, una enzima clave del proceso de oxidación de NH_4^+ .

La actividad BNI de pasturas de *Brachiaria* también fue validada a través de la disminución en la emisión de N_2O en el campo (Arango et al. 2014, Subbarao et al. 2009) y existe un potencial para el mejoramiento genético de plantas con mayor capacidad BNI (Subbarao et al. 2013a).

1.4. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Estudiar las actividades desnitrificante y oxidante del amonio, el tamaño de las poblaciones cultivables de dichos microorganismos, la mineralización de N y la emisión de N_2O , en suelos representativos de dos zonas de cultivo de arroz del este y norte del país.

Comprobar y comparar el potencial inhibitorio de la nitrificación de exudados radicales de dos cultivares de arroz, El Paso L 144 (origen india) e INIA Tacuarí (origen japónica).

Evaluar el efecto de los exudados de los dos cultivares sobre la actividad y abundancia de microorganismos nitrificantes, en suelos del este y norte del país.

1.5. HIPÓTESIS

Un suelo del norte del país sobre basalto, con mayor contenido de MO y bases intercambiables, favorece la actividad nitrificante y desnitrificante así como el número de esos microorganismos y por tanto la emisión de N_2O .

Exudados de cultivares de arroz tienen potencial de inhibir la nitrificación y este varía con el cultivar.

La inhibición de la nitrificación por exudados de arroz varía con el tipo de suelo y afecta la actividad y abundancia de microorganismos nitrificantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. EMISIÓN DE N₂O, MINERALIZACIÓN, NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN EN DOS ARROZALES DE URUGUAY

2.1.1. Sitios de experimentación y manejo del cultivo

Los dos arrozales evaluados estaban ubicados en los departamentos de Treinta y Tres (zona este) y de Salto (zona norte), en la Unidad Experimental Paso de la Laguna del INIA Treinta y Tres (33°15' S, 54°10' O) y en un predio comercial perteneciente a la Unidad de suelo Itapebí-Tres Árboles (31°22'S, 57°27'O), respectivamente. Para el ensayo de invernáculo se trajo suelo de esas localidades previo a la siembra de arroz. Las propiedades fisicoquímicas de los suelos se resumen en la tabla 1. Se sembró el cultivo de arroz cv. El Paso L 144 a una densidad de 150 kg ha⁻¹ en un diseño completamente al azar (n=4). Se inundó a macollaje y se realizó una fertilización nitrogenada fraccionada (Tabla 2).

Los muestreos de los suelos se realizaron a la siembra, macollaje, primordio floral y a la madurez del cultivo. Cada muestra consistió en seis submuestras de 15 cm de profundidad para hacer una muestra compuesta y se mantuvieron a 5 °C para su posterior análisis. Se determinó el potencial de mineralización de N, la actividad potencial y el número de microorganismos oxidantes del amonio y desnitrificantes, y el contenido de N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻ del suelo.

El experimento de campo se realizó durante la zafra de arroz 2013-14 y la información meteorológica se registró en las estaciones ubicadas en Paso de la Laguna - INIA Treinta y Tres y en INIA Salto Grande. La temperatura promedio durante el ciclo del cultivo fue 21,3 °C y 23,4 °C para Treinta y Tres y Salto, respectivamente. La precipitación acumulada durante el ciclo del cultivo para Treinta y Tres fue 762 mm, de los cuales se registraron 222 mm previo a la inundación. En Salto la precipitación fue 882 mm y previo a la inundación se registraron 376 mm. La amplitud térmica tuvo un valor promedio de 11,8 °C y 11,5 °C a lo largo del ciclo del arroz para Treinta y Tres y Salto, respectivamente.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos de Salto y Treinta y Tres.

	Salto (norte)	Treinta y Tres (este)
Tipo de suelo	Vertisol háplico	Brunosol subeútrico típico
Textura	Arcillo-limoso	Arcillo - limoso
pH (H ₂ O)	5,6	5,7
Materia orgánica (%)	5,8	3,4
P (ppm)	10	13
K (cmol _c /kg)	0,62	0,42
Mg (cmol _c /kg)	9,4	3,3
Ca (cmol _c /kg)	25,5	5,4
Na (cmol _c /kg)	0,64	0,83

Tabla 2. Muestreo de los suelos y manejo del cultivo de arroz de los suelos de Salto y Treinta y Tres.

Muestreo	Fecha*		Manejo del cultivo
	Salto	Treinta y Tres	
Siembra (inmediato a la siembra y fertilización)	8/10/12	8/10/12	Fertilización con 140 kg de NP 18-46 ha ⁻¹
	25/10/13	24/10/13	
Macollaje (posinundación y fertilización)	30/11/12	30/11/12	Inundación del cultivo Fertilización con Urea 50 kg ha ⁻¹
	29/11/13	09/12/13	
Primordio Floral (posfertilización)	16/01/13	16/01/13	Cultivo permanece inundado Fertilización con Urea 50 kg ha ⁻¹
	3/01/14	13/01/14	
Madurez (posdrenado del cultivo)	21/03/13	21/03/13	Drenado del cultivo
	13/03/14	14/03/14	

* Las fechas del 2012-2013 corresponden al ensayo de invernáculo y las de 2013-2014 al ensayo de campo

2.1.2. Medidas de óxido nitroso

Los flujos de N₂O emitidos se monitorearon con la técnica de cámaras cerradas estáticas descritas para arroz por Lindau et al. (1991). Las cámaras consistieron en bases de acero inoxidable de 40 cm de diámetro y 20 cm de altura parcialmente insertas en el suelo (5 cm), que permanecieron instaladas durante todo el ciclo de

cultivo (Figura 2). En el experimento a campo las fechas de muestreo de gases coincidieron con los muestreos de suelos y en el invernáculo se tomaron muestras de forma continua hasta el macollaje del cultivo, posinundación y fertilización. 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 (Irisarri et al. 2012). Las cámaras contaban con un ventilador operado con una batería que se prendía 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. Las muestras de gases del interior de las cámaras se tomaron con jeringas plásticas de 25 mL a los tiempos 0, 15 y 30 minutos y se almacenaron en tubos con vacío (10 mL) 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. El análisis de N_2O 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 del gas se calculó según Watanabe et al. (2000) y las medidas de cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron promediadas para determinar el valor final de emisión por tratamiento.

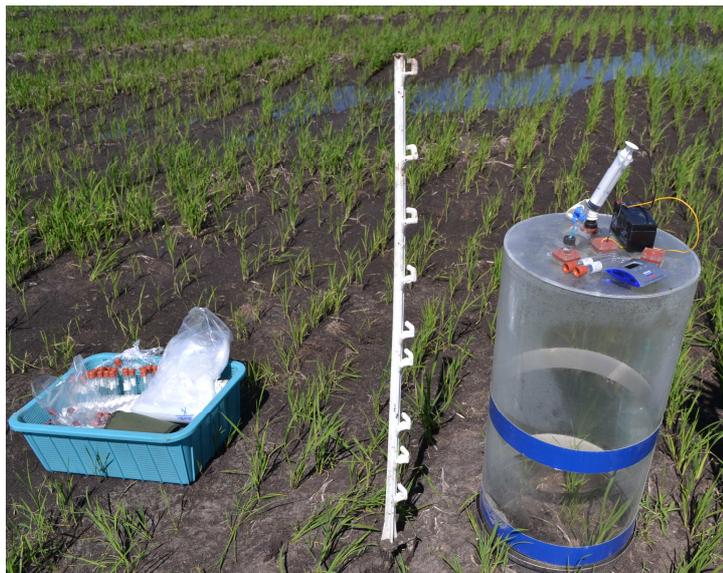


Figura 2. Cámara estática utilizada en la medición de óxido nítrico.

2.1.3. Actividades potenciales microbianas

2.1.3.1. Actividad potencial de mineralización de nitrógeno

El potencial de mineralización de nitrógeno se realizó en anaerobiosis según Kandeler (1996a). Se incubaron tubos herméticos con 15 g de suelo fresco y 15 mL de agua destilada por una semana a 40 °C. Posteriormente, se extrajo el suelo con 15 mL de KCl 2 M, se filtró con papel *Whatmann* n° 42 y se determinó el contenido de NH_4^+ colorimétricamente según el método de *Berthelot* (Rhine et al. 1998). El contenido de NH_4^+ producido se expresó como $\text{mg N-NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ de suelo seco (ss).

2.1.3.2. Actividad potencial de oxidación de amonio

La actividad potencial de oxidantes de NH_4^+ se determinó según Kandeler (1996b) con algunas modificaciones. Al suelo húmedo (2,5 g) se le adicionó 7,5 mL de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,33 mM, 0,05 mL de clorato de sodio 1,5 M para inhibir la conversión biológica de NO_2^- a NO_3^- (Belser y Mays 1980) y 2,5 mL de agua destilada estéril. La suspensión se incubó a 28 °C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Wishshake SHO-2D, Witeg Germany) por 24 horas y como controles se mantuvieron suspensiones de suelo a -20 °C. Luego de la incubación se extrajo la suspensión con 15 mL de KCl 2 M, se centrifugó a 13.000 rpm y 0,5 mL del sobrenadante se resuspendió con 0,5 mL de NH_4Cl 0,19 M. Se midió el contenido de NO_2^- por la reacción colorimétrica con los reactivos *de Griess-Ilosvay* por espectrofotometría a 540 nm. La actividad se expresó como $\mu\text{g NO}_2\text{-N d}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ss.

2.1.3.3. Actividad potencial de desnitrificación

La actividad potencial desnitrificante se realizó mediante un ensayo enzimático de inhibición con C_2H_2 (Guynot et al. 1998). Se incubaron 4 g de suelo húmedo con 2 mL de glucosa 1 mM y 2 mL de nitrato de potasio (KNO_3) 1 mM en viales herméticos. En cada vial se reemplazó la atmósfera por una mezcla de nitrógeno molecular (N_2) y acetileno (C_2H_2) al 10% del volumen para lograr condiciones anaeróbicas e inhibir la actividad N_2O reductasa. Se tomaron tres muestras de gas durante un período de incubación de 2 hs a 25 °C para medir la producción de N_2O

por cromatografía gaseosa, según Perdomo et al. (2009). La actividad desnitrificante se expresó como $\mu\text{g N}_2\text{O h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ss}$.

2.1.4. Recuento de microorganismos

Se realizaron recuentos de bacterias cultivables, oxidantes de amonio y desnitrificantes por la técnica de número más probable (NMP) para cada muestreo de suelo. Se suspendieron 10 g de suelo fresco en 90 mL de buffer fosfato y se realizaron diluciones seriadas de 1 en 10.

Para el recuento de microorganismos oxidantes de amonio se utilizaron tubos con 4 mL de medio mineral con 5 g L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Schmidt y Belser 1994). Se incubaron por un mes en agitación a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y oscuridad. Los tubos positivos (presencia de NO_2^-) se determinaron con los reactivos de *Griess-Ilosvay*.

En el caso de los microorganismos desnitrificantes, el recuento consistió en tubos anaeróbicos con 5 mL de medio rico con KNO_3 $0,25 \text{ g L}^{-1}$. La atmósfera se reemplazó con N_2 y C_2H_2 y se incubaron por dos semanas en oscuridad a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Los tubos positivos se determinaron por la desaparición del sustrato NO_3^- con tiras *Quantofix* (Macherey-Nagel, Alemania) y por la aparición de N_2O por cromatografía gaseosa (Tiedje 1994). Tanto para el recuento de desnitrificantes como de oxidantes del amonio, los resultados se refirieron a tablas de probabilidad (Alef y Nannipieri 1995).

2.1.5. Cuantificación del nitrógeno mineral

Al suelo húmedo (5 g) se le agregó 15 mL de KCl 2M para su extracción, se agitó por 30 minutos y posteriormente se filtró la suspensión con papel *Whatmann* n° 42. El contenido de N-NO_3^- se determinó según (Mulvaney 1996) y el N-NH_4^+ según Rhine et al. (1998). El N mineral se representó como la suma de N-NH_4^+ y N-NO_3^- .

2.2. ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARROZ

2.2.1. Obtención de compuestos BNI de arroz

2.2.1.1. A partir de exudados radicales de arroz

Se obtuvieron compuestos exudados de raíces de dos cultivares de arroz para estimar la BNI producida a través de un bioensayo con la cepa de *N. europaea* o en incubaciones con suelos. Para ello se crecieron plantas de cv. INIA Tacuarí (*Oryza sativa* L. ssp. japónica) y cv. El Paso L 144 (*Oryza sativa* L. ssp. índica), denominados de aquí en adelante “Tacuarí” y “El Paso”, en macetas con una relación 50:50 de suelo y arena, en el invernáculo (Figura 3). Se utilizaron suelos de Salto y de Treinta y Tres (Tabla 3). Cada maceta contenía tres plantas que se cosecharon a los 32 y 56 días de la siembra (n=4). Las plantas se lavaron con agua corriente con cuidado de no dañar las raíces. El último lavado fue con agua destilada y luego las plantas se depositaron en frascos con una solución de captura de los compuestos exudados por las raíces (Figura 3). La colecta de los exudados fue por 24 horas en 500 mL de una solución que contenía 1mM de NH₄Cl y 200uM de CaCl₂ según Tanaka et al. (2010). De los 500 mL colectados, 250 se secaron en un rotavapor (Büchi R-114, Suiza), se resuspendieron en 5 mL de metanol (metOH), se volvieron a rotaevaporar y finalmente se resuspendieron en 25 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 3). Los otros 250 mL también se rotaevaporaron y resuspendieron en metOH, pero luego se resuspendieron en 2 mL de agua bidestilada para ser utilizados en ensayos de incubación con suelos (ver experimento 1).

También se obtuvieron compuestos exudados de raíces de los dos cv. crecidos en hidroponia durante un mes para evaluar su efecto inhibitor de la nitrificación sobre el suelo (ver experimento 2). El sistema hidropónico consistió en cajones de 40 x 60 x 32 cm con una solución mineral *Yoshida* renovada cada semana (Subbarao et al. 2006b) y aireación continua. Las plantas se mantuvieron a 25 °C y fotoperíodo 16/8 hs luz/oscuridad. Cada muestra de 20 plantas con tres repeticiones por cultivar, se sumergió en 200 mL de la solución trampa. Luego de filtrada la solución con filtros

de membrana de 0,22 μm se secó en un liofilizador (*labotectgroup* 01.JLG-12FD, China). Se resuspendió en 10 mL de metOH, se rotaevaporó, se volvió a repetir el procedimiento anterior y finalmente se resuspendió en 1,5 mL de agua bidestilada (Tanaka et al. 2010). Se realizó el mismo procedimiento con la solución trampa sin exudados para incorporar a los suelos como control.



Figura 3. Plantas de arroz crecidas en macetas con suelo:arena (1), colecta de los exudados radicales en una solución de captura por 24 hs (2) y concentración de los exudados por rotoevaporación (3).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de los suelos de Salto y Treinta y Tres.

Suelo:	pH	%			ppm		cmol _c /kg				%			Clase textural
	H ₂ O	M.O	N	N-NO ₃	P	Ca	Mg	K	Na	Arena	Limo	Arcilla		
Salto	5,3	4,4	0,25	13	4	17,1	6,2	0,41	0,42	18,6	52,3	29,1	Franco arcillo limoso	
Treinta y Tres	5,1	2,8	0,16	10	16	6,3	2,4	0,21	0,44	24,3	48,4	27,3		Franco arcilloso

2.2.1.2. A partir de extracto de raíces de arroz

Se obtuvieron extractos de tejido radical de los cv. de arroz Tacuarí y El Paso para evaluar su efecto BNI y si este era comparable al obtenido por los exudados radicales de las mismas plantas. Se utilizó el mismo sistema hidropónico para la obtención de raíces de plantas crecidas durante un mes. Se usaron cinco repeticiones por cultivar, cada una compuesta por cinco plantas que fueron sumergidas por 24 horas en 200 mL de la solución trampa. Otro conjunto de plantas no fueron estimuladas, para corroborar si el efecto BNI aumentaba en plantas estimuladas con la solución trampa en comparación con las plantas sin estimular. Las raíces se lavaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente para luego macerarlas con N líquido. El tejido recuperado en forma de pequeños fragmento se llevó a molienda fina en

microtubos de 1,5 mL con balines de 1mm de diámetro y agitación con un agitador de pintura (Harbil paint mixer) durante tres minutos. Posteriormente se resuspendieron cada 100 mg de tejido radical en 1,5 mL de metOH. Las diferentes cantidades de tejido de cada repetición, se normalizaron por el volumen de metOH agregado. Las muestras obtenidas se agitaron en un agitador (Fisher vortex genie 2) a máxima revolución durante cinco minutos y se dejaron durante quince minutos a temperatura ambiente. Los extractos se filtraron con jeringas de 3 mL y filtros de 0,22 mm (Ministat). Los extractos limpios se secaron por vacío en un concentrador (Eppendorf concentrator 5301) durante 4 horas a 30 °C. Los extractos secos se resuspendieron en 25 µL de DMSO. Se usaron dos cantidades diferentes de tejido de *B. humidicola* 679 para verificar si se obtenía el mismo potencial BNI que con las muestras de tejido de arroz de las que se recuperó poca cantidad de tejido (7,5 mg) y 100 mg (Nuñez 2015).

2.2.2. Bioensayo de inhibición de la nitrificación

El bioensayo fue desarrollado por Subbarao et al. (2006b) para cuantificar el potencial BNI de una especie vegetal. El bioensayo se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Laboratorio de Agrobiodiversidad de Forrajes Tropicales bajo la supervisión del Dr. J. Arango y el Msc. J. Nuñez. Siguiendo la metodología propuesta por Subbarao et al. (2006b) se incubó el cultivo bacteriano con los exudados o tejido de los cv. de arroz evaluados y como control la solución trampa sin exudados resuspendida en DMSO. También se incorporaron dos genotipos de inhibición conocida de la nitrificación, *B. humidicola* CIAT 679 y *B. humidicola* CIAT16888. La mezcla se realizó con 2 µl de exudado o extracto de raíz, 198 µl de agua destilada y 250 µl del cultivo bacteriano (densidad óptica de 0,6). Cuatro repeticiones por cada exudado o extracto de raíz evaluado se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a 25 °C y 700 rpm en un agitador (Thermomixer eppendorf 3420), para después realizar la lectura con 100 µL. La luminiscencia se cuantificó con un luminómetro glomax 20/20 (promega) a partir de la inyección de 25µL de decanal al 1% que actúa como sustrato de la luciferasa y de un tiempo de integración de 10 segundos. Cada unidad de luz relativa (RLU) dado por el

luminómetro, se transformó a porcentaje de inhibición con los valores de RLU del control que corresponde al 100% de luminiscencia. El porcentaje de inhibición de los exudados se transformó a unidades estándar del inhibidor sintético alitiourea (ATU), donde una unidad corresponde al 80% de inhibición de la luz emitida por esta cepa de *Nitrosomonas*.

2.3. ESTIMACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN EN SUELOS

2.3.1. Experimento 1

Este primer experimento de microcosmos se realizó en placas de petri con 40 g de suelo tamizado (trama de 2mm) y homogeneizado, mantenido con una humedad equivalente a 60 % de capacidad de retención de agua por dos semanas, según Nardi et al. (2013) con modificaciones. Se utilizaron los suelos de Treinta y Tres y Salto y los tratamientos fueron los siguientes: (1) Nitrógeno, 100 mg kg⁻¹ de suelo (sustrato para la nitrificación) como (NH₄)₂SO₄, (2) Nitrógeno mas exudado radical del cultivar Tacuarí, (3) Nitrógeno mas exudado radical del cultivar El Paso, (4) Nitrógeno mas diciandiamida (DCD, C₂H₄N₄), un inhibidor sintético de la nitrificación, a una concentración de 50 µg g⁻¹ de suelo y (5) un control con agua destilada. Se prepararon soluciones stock de (NH₄)₂SO₄ y DCD a una concentración de 71 mM y 24 mM, respectivamente. Las soluciones de riego sobre el suelo se prepararon mediante la mezcla de 2 mL de (NH₄)₂SO₄ 71 mM con 2 mL de exudado de arroz (colectados de plantas crecidas en macetas con los suelos) o 2 mL de (NH₄)₂SO₄ 71 mM con 1 ml de DCD 24 mM (para obtener la concentración de 50 µg g⁻¹ de suelo) y el resto de agua destilada para completar el 60 % de capacidad de retención de agua de los suelos. Las placas con suelos se preincubaron por una semana con una humedad equivalente al 40% de capacidad de retención de agua a 25 °C en oscuridad. Posteriormente se aplicaron las soluciones y se tomaron muestras de suelo a los 7 y 14 días de incubados para medir el contenido neto de NH₄⁺ y NO₃⁻ (se le restó el contenido basal de NH₄⁺ y NO₃⁻ de los suelos representado por el tratamiento de riego con agua destilada) y calcular el porcentaje de inhibición de la nitrificación, a partir de la siguiente fórmula:

$$100 - \frac{(T2-T1)*100}{(C2-C1)}$$

T2 y T1 representan el NO_3^- acumulado de 14 a 7 días de incubados los suelos, respectivamente y C2 y C1 representan el NO_3^- acumulado del control (Nitrógeno) para el mismo período de incubación (Ghoneim et al. 2014).

2.3.2. Experimento 2

Se volvió a repetir el experimento con algunas modificaciones. Para conocer la dinámica de nitrificación de los suelos se realizó una estandarización según la metodología de incubación de suelo propuesta por Ipinmoroti et al. (2008) y se cuantificó la producción de NO_3^- durante diez días. A 5 g de suelo seco y homogenizado colocados en frascos ámbar, se agregó 1,5 mL de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 27 mM para mantener la capacidad de retención de agua al 60% y se incubó a 25 °C y oscuridad. Como control negativo se incluyeron dos dosis de DCD, 12,07 mg (DCD 10%) y 24,8 mg (DCD 20%) en 100mL de la solución de incubación que contenía 27 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para ser aplicado a los suelos evaluados. Los frascos se taparon con *parafilm* permitiendo el intercambio gaseoso y cada dos días se analizó el contenido de NO_3^- . Se aplicó un método destructivo de muestreo para cada tiempo con tres réplicas técnicas.

A partir de la estandarización se repitió el experimento mediante la incubación de los suelos con exudados radicales de los cv. de arroz en estudio, colectados de plantas crecidas en hidroponia. Se utilizó la misma metodología de incubación antes mencionada y se definieron los siguientes tratamientos: (1) Nitrógeno (27 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (2) Nitrógeno mas exudado radical del cultivar Tacuarí, (3) Nitrógeno mas exudado radical del cultivar El Paso, (4) Nitrógeno mas 24,8 mg de DCD y (5) Nitrógeno mas la solución de colecta sin exudados. Las soluciones de los tratamientos con exudados consistieron en 1,5 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 27 mM y 0,5 mL del exudado concentrado resuspendido en agua bidestilada y lo mismo para el tratamiento de la solución trampa sin exudados. Se determinó el porcentaje de inhibición de la nitrificación (como se describió en el experimento 1) de un periodo de 12 días de incubación de los suelos con las soluciones.

2.3.3. Cuantificación de arqueas y bacterias oxidantes del amonio

La abundancia del gen *amoA* de AOA y AOB se determinó por PCR en tiempo real con un termociclador *Rotor-Gene 6000* (*Corbett Research Ltd.*, Reino Unido), con el fluoróforo *SYBR Green I*. Se realizaron tres réplicas técnicas por cada muestra y para los estándares. La mezcla para AOA (12,5 µL) contenía 6,25 µL de *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*), 10 µg de sero albumina bovina, 2,5% (v/v) DMSO, 0,5 µM de los siguientes *primers*: Arq-amoAF (50-STA ATG GTC TGG CTT AGA CG-30) y Arq-amoAR (50-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT-30) (Francis *et al.* 2005) y 2 µL de ADN molde. El ciclo fue: 95 °C por 10 min. y 40 x (95 °C, 45 sec.; 53 °C, 45 sec.; 72 °C, 45 sec.), 79 °C, 15 sec. para la obtención de datos y al final del programa se realizó una curva de *melting* desde 65 °C a 90 °C. La curva estándar se realizó mediante la amplificación de diluciones decimales de una mezcla de plásmidos linearizados *pJET1.2/blunt* con cinco genes *amoA* de arqueas (Azziz *et al.* 2016). La eficiencia del PCR varió desde 85 % a 102 %, con un promedio de 94 %, y un coeficiente de correlación de 0,99.

La mezcla para AOB (10 µL) contenía 5µL de *QuantiNova SYBR Green* (*Qiagen*), 10 µM de cada *primer*: amoA-1F (50-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-30) (Rotthauwe *et al.* 1997) y amoA-2Rs (50-CCT CKG SAA AGC CTT CTT C-30) modificado de Rotthauwe *et al.* (1997) para minimizar la formación de dímeros y 1 µL de una dilución 1/10 del ADN molde. El ciclo fue: 95 °C por 2 min. y 40 x (95 °C, 5 sec.; 60 °C, 10 sec.), 80 °C, 15 sec. para la obtención de datos y el programa finalizó con una curva de *melting* desde 72 °C a 90 °C. La curva estándar se realizó mediante la amplificación del plásmido linearizado *pJET1.2/blunt* que contenía el gen *amoA* de *Nitrosomonas europaea*. La eficiencia del PCR fue de 84 % y 101 % y un coeficiente de correlación de 0,99. La especificidad del producto amplificado fue confirmada con las curvas de *melting* y en geles de agarosa 1% para visualizar el tamaño del producto esperado.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar el efecto del momento del cultivo de arroz y el tipo de suelo sobre las actividades potenciales, el NMP de microorganismos oxidantes de NH_4^+ y desnitrificantes y el contenido de NH_4^+ y

NO_3^- . Los datos de NMP fueron transformados a logaritmo en base 10 para su análisis. Se corroboró el efecto de la interacción entre los factores suelo x momento del cultivo del arroz y la normalidad y homocedasticidad de los residuales. Para determinar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se realizó un *test de Tukey* ($p < 0,05$) y también se realizaron análisis de correlación de *Pearson* (r) entre algunas de las variables.

Para comprobar si hubo diferencias en el potencial de inhibición entre cultivares, por el estadio de la planta y el tipo de suelo se realizó un ANAVA y se comprobó si hubo interacción entre los factores. Se utilizó como prueba *post-hoc* el *test de Tukey* ($p < 0,05$). Para todas las variables estudiadas se presentan las medias más los errores estándar y los análisis se realizaron con el *software* estadístico Infostat (Di Rienzo et al. versión 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EMISIÓN DE N₂O, MINERALIZACIÓN, NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN EN DOS ARROZALES DE URUGUAY

En esta parte de la tesis se presentan los resultados de un ensayo de invernáculo y otro a campo, dónde se sembró el cv. de arroz El Paso en dos suelos con distinto contenido de MO, entre otras características, representativos de las principales zonas del cultivo de arroz del este y norte del país, Treinta y Tres y Salto, respectivamente.

3.1.1 Flujos de N₂O

En la figura 4 se presentan los flujos de N₂O emitidos por los suelos cultivados con arroz en el experimento de invernáculo. La emisión de N₂O se registró hasta el macollaje del cultivo y no se observaron diferencias significativas entre suelos. Se detectó un solo pico de emisión después de la fertilización e inundación al macollaje del cultivo, al igual que lo obtenido en otros estudios en el suelo del este (Tarlera et al. 2016, Irisarri et al. 2012, Pereyra 2009, Domínguez et al. 2007). El pico de N₂O registrado fue en promedio de 135 g N ha⁻¹ día⁻¹ mayor a lo reportado por Irisarri et al. (2012) en las mismas condiciones experimentales. Este aumento en la emisión de N₂O, en el momento en que la inundación del cultivo coincidió en el tiempo con la fertilización, podría deberse a que al aumentar el contenido de humedad en el suelo el potencial redox puede tornarse levemente reductor y promover así los procesos de desnitrificación y de nitrificación desnitrificante (Tarlera et al. 2009).

La emisión de N₂O ocurriría en momentos puntuales del ciclo del cultivo del arroz en respuesta, entre otros factores, a la condición redox del suelo y a la fertilización del cultivo. La variación espaciotemporal en la emisión de N₂O ha sido señalada anteriormente (Groffman 2012). Esta variación conlleva dificultades para el modelado de las emisiones, así como en la aplicación de test estadísticos (Bakken et al. 2012, Groffman 2012).

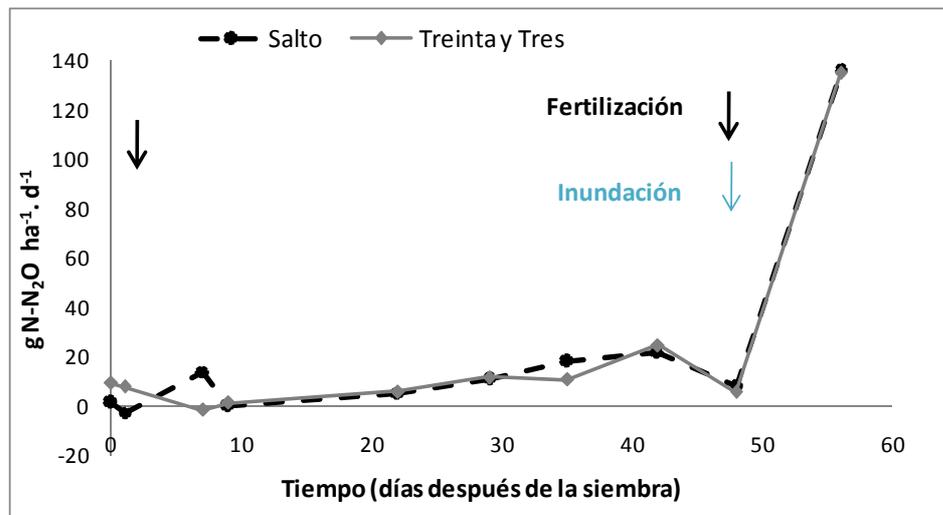


Figura 4. Evolución del flujo de N₂O hasta los 56 días de sembrado el arroz en suelo de Salto y Treinta y Tres en experimento de invernáculo. Cada punto de la gráfica corresponde a la media del flujo calculado a partir de seis cámaras estáticas.

La emisión de N₂O correspondiente a las fechas en que se realizaron los muestreos de suelos en el experimento a campo se observa en la figura 5. No se constataron diferencias significativas en los flujos de N₂O para los dos sitios experimentales, salvo para el último muestreo en que el arrozal de Salto emitió más que el de Treinta y Tres, 44,2 y -20,8 g N-N₂O ha⁻¹ d⁻¹, respectivamente (Figura 5). En esta última medición, a la madurez del cultivo, ambos suelos se habían drenado, pero en el de Salto con mayor pendiente (1,4% comparado a 0,8% en Treinta y Tres), probablemente el drenado fue más rápido, lo que podría explicar el pico de emisión de N₂O. El aumento en la emisión de N₂O producido luego de drenado el cultivo, también ha sido reportado por otros autores (Adviento-Borbe et al. 2015, Irisarri et al. 2012, S. Liu et al. 2010, Towprayoon et al. 2005). Irisarri et al. (2012) atribuyen este evento a la liberación del N₂O atrapado en el suelo y a las condiciones redox óptimas para la producción de N₂O. Por otro lado, el aumento en la emisión de N₂O a la madurez del cultivo podría deberse al aumento en la mineralización del N (von Arnold et al. 2005) ya que coincide con el mayor PMN y contenido de N mineral (Figura 7) en el suelo de Salto. La mayor disponibilidad de N mineral en el suelo podría estimular los procesos de nitrificación y desnitrificación implicados en la producción de N₂O.

Si bien se observaron flujos promedios negativos en algunos de los muestreos, la alta variabilidad de las emisiones no permitió detectar diferencias entre las distintas fechas. Majumdar (2013) revisó la capacidad de los suelos de arrozales de actuar como sumideros de N_2O y comunicó una mayor capacidad de consumo de N_2O en suelos inundados que en aquellos que no lo están. En suelos cultivados con arroz se han reportado tasas de consumo de N_2O que variaron desde $-0,13$ a $-191 \mu g N m^{-2} h^{-1}$. El N_2O puede ser directamente consumido por desnitrificación o difundirse desde la atmósfera al suelo (Majumdar 2013). Sin embargo, al menos otros cinco procesos microbianos se postulan como sumideros de N_2O : por nitrificación desnitrificante (Schmidt et al. 2004), por reducción del N_2O por una N_2O reductasa atípica (NosZ II), por la reducción desasimilatoria del NO_3^- a NH_3 (DNRA), por fijación del N_2O vía nitrogenasa o de forma indirecta por la combinación de la reducción de N_2O y la fijación de N_2 (van Groenigen et al. 2015).

Ensayos previos en Treinta y Tres evidenciaron picos de N_2O en la etapa vegetativa del arroz (Tarlera et al. 2016, Irisarri et al. 2012). Si bien en este estudio se consideraron los posibles momentos con máxima emisión, no pudieron observarse esos picos en los momentos de muestreo.

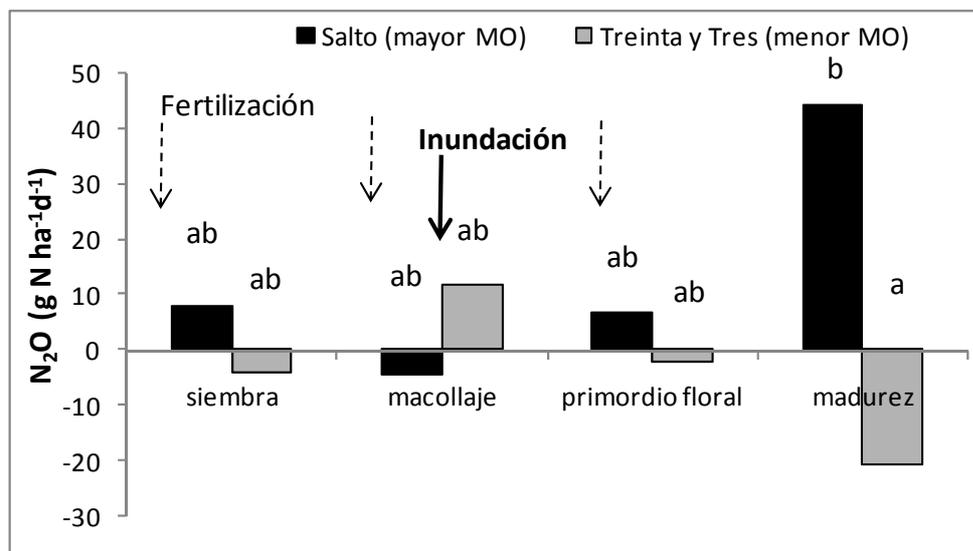


Figura 5. Flujo de N_2O del cultivo de arroz en suelo de Salto y Treinta y Tres en experimento de campo. Cada barra corresponde a la media del flujo calculado a partir de cuatro cámaras estáticas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos ($p < 0,05$).

No se encontró correlación entre el NO_3^- ni el N mineral del suelo con el flujo de N_2O , pero sí con el NMP de desnitrificantes en el experimento a campo (Tabla 4). Si bien el NO_3^- es el aceptor de electrones en la desnitrificación, una correlación positiva entre el NO_3^- del suelo y la emisión de N_2O no siempre es esperable, ya que NO y N_2 también son producidos en este proceso y existen múltiples factores como la heterogeneidad espacial del suelo y la diversidad microbiana que explican la dinámica de los procesos involucrados.

Hou et al. (2000) tampoco encontraron correlación entre la emisión de N_2O y el NMP de desnitrificantes mientras que Das y Adhya (2014) encontraron una correlación positiva entre el N_2O emitido y la actividad y número de nitrificantes y desnitrificantes.

Tabla 4. Correlaciones entre parámetros bioquímicos y microbiológicos de suelos cultivados con arroz.

<i>Parámetros bioquímicos y microbiológicos</i>	<i>N₂O</i>	<i>NMP Desnitrificantes</i>	<i>NMP Oxidantes de NH₄⁺</i>	<i>AO-NH₄⁺</i>	<i>AED</i>	<i>MN</i>	<i>NO₃⁻</i>
NH ₄ ⁺	0,25	0,52	0,25	-0,02	-0,24	0,25	-0,34
NO ₃ ⁻	0,23	0,04	-0,16	-0,26	-0,06	-0,24	–
Mineralización de N (MN)	-0,08	0,09	0,42*	0,06	-0,05	–	–
Actividad enzimática desnitrificante (AED)	-0,25	-0,07	-0,11	-0,14	–	–	–
Actividad oxidante de NH ₄ ⁺ (AO-NH ₄ ⁺)	-0,14	-0,07	-0,18	–	–	–	–
NMP de Oxidantes de NH ₄ ⁺	0,05	0,03	–	–	–	–	–
NMP de Desnitrificantes	0,53**	–	–	–	–	–	–

Sin símbolo: no significativo

* p<0,05

** p<0,01

3.1.2 Mineralización neta

La mineralización del N del suelo es un proceso clave para la provisión de este nutriente a la planta de arroz ya que la mayoría es absorbido a partir de este proceso, aún en suelos fertilizados (Irisarri et al. 2007). La mineralización determina el N potencialmente disponible para la planta y en caso de no ser usado por esta puede perderse del suelo por volatilización o por desnitrificación previa nitrificación.

El PMN no fue diferente entre los suelos con diferente porcentaje de materia orgánica (Figura 6a y 7a), pero sí entre momentos del cultivo de arroz. El mayor PMN se presentó hacia los estadios de primordio floral y madurez del cultivo tanto en el invernáculo como en el campo, si bien en el invernáculo el PMN fue mayor a madurez que a primordio, 10,3 y 4,6 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ ss d⁻¹, respectivamente. En el campo la mayor actividad potencial de mineralización fue en promedio 4,5 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ ss d⁻¹ y fue significativamente diferente al PMN a la siembra (en promedio 1,6 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ ss d⁻¹). La mineralización depende de múltiples factores y la cantidad y calidad de la MO del suelo no sería el factor principal que explica la mineralización del N (Yeasmin et al. 2012). Otros factores parecen ser claves en la mineralización de N como el tipo de suelo (textura y tipo de arcilla) y la presencia de otros aceptores de electrones en condiciones de anaerobiosis (Mn⁴⁺, Fe³⁺, SO₄²⁻). Además, a lo largo del ciclo del cultivo el contenido de raíces es mayor, varían los exudados radicales y restos celulares disponibles en el suelo. Este aumento en la cantidad de materia orgánica fácilmente degradable podría explicar el aumento de la mineralización hacia el final del cultivo de arroz (Ghosh y Kashyap 2003).

En este trabajo se encontró una alta correlación del PMN con la temperatura para el suelo con mayor contenido de MO en el experimento de campo ($r = 0,99$, $p=0,01$). Ando et al. (1992) comunicaron que el PMN aumentaba entre 25 y 30 °C. Con la medición del PMN se considera la mineralización neta; en el caso del suelo inundado si bien se espera una menor mineralización bruta también la inmovilización de N por microorganismos sería menor. Vityakon y Dangthaisong (2005) también encontraron mayor mineralización en suelos inundados que en condiciones aeróbicas y se atribuyó a un menor requerimiento de N por la microflora debido a una mayor proporción de bacterias respecto a hongos y actinobacterias en los suelos inundados. El establecimiento de la inundación por otro lado, pudo favorecer la muerte de algunos microorganismos que constituirían un pool de N fácilmente mineralizable y favorecer la reducción de Fe⁺³ que a su vez promueve la liberación de parte de la MO protegida por minerales y libera el NH₄⁺ fijado (Kader et al. 2013).

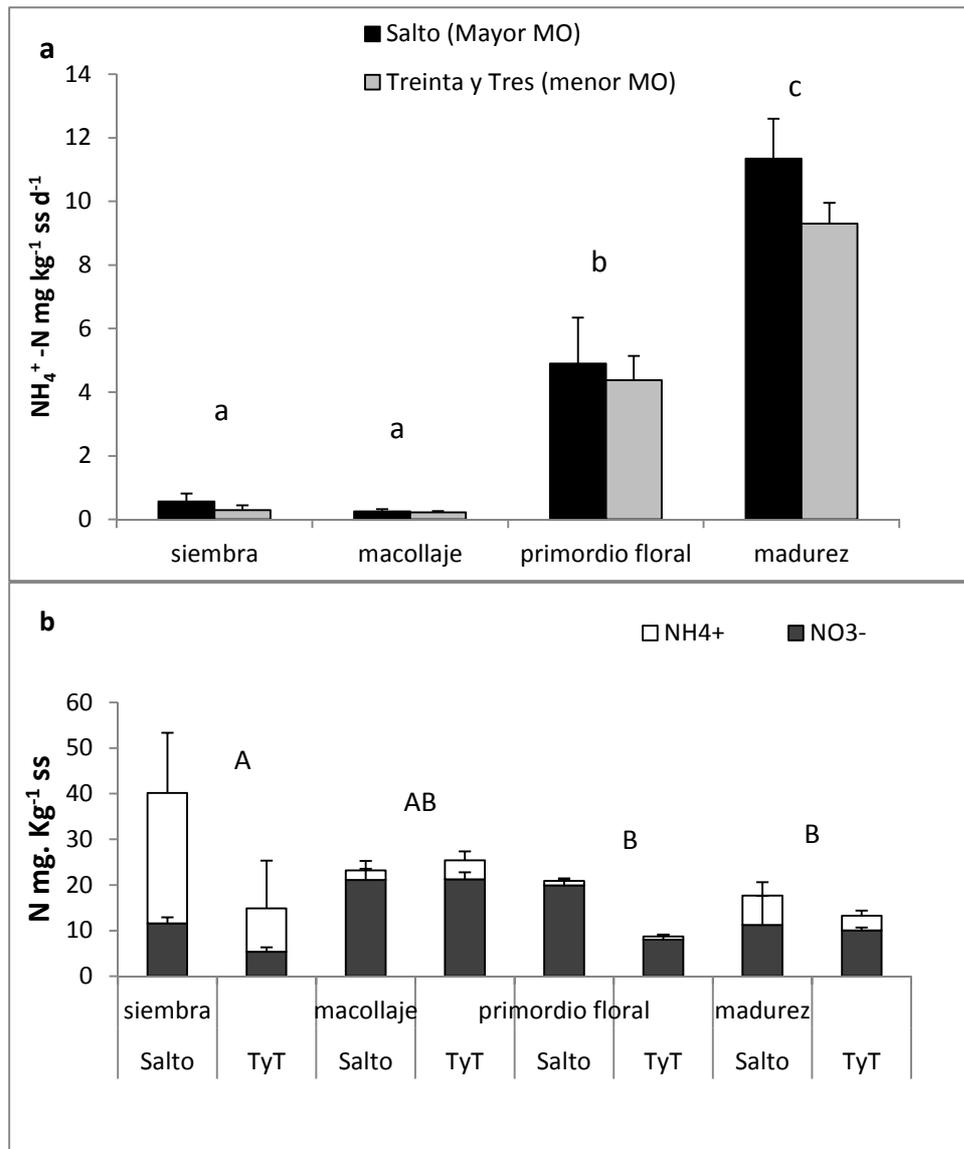


Figura 6. (a) Actividad potencial de mineralización ($\text{mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1} \text{ ss d}^{-1}$) en suelos de Salto y Treinta y Tres (TYT) y (b) Nitrógeno mineral ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^- \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$) en cuatro momentos del cultivo de arroz en experimento de invernáculo. Las barras representan la media + el error estándar ($n=4$). Letras diferentes indican diferencias significativas por momento del cultivo de arroz ($p<0,05$).

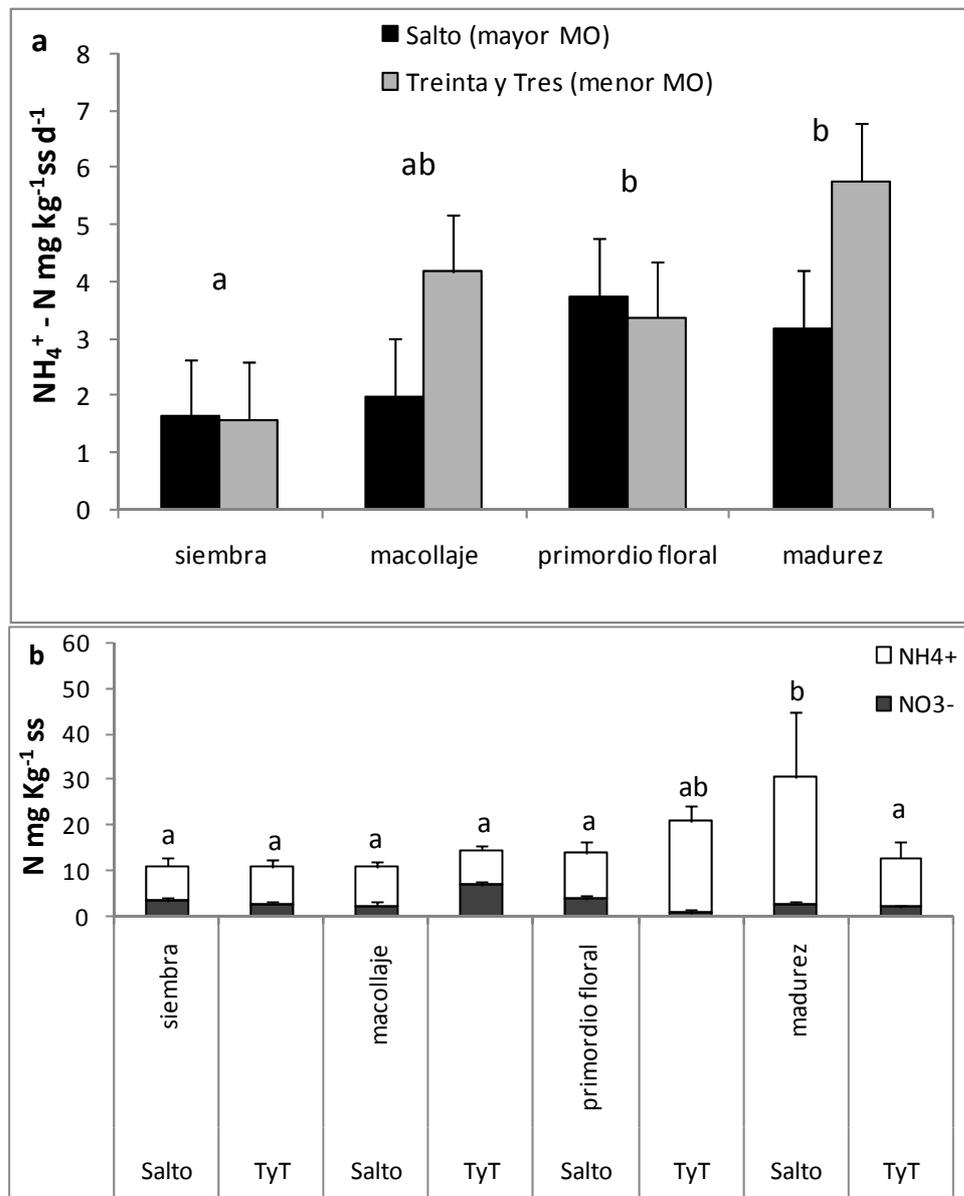


Figura 7. (a) Actividad potencial de mineralización ($\text{mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1} \text{ ss d}^{-1}$) en suelos de Salto y Treinta y Tres (TYT) y (b) Nitrógeno mineral ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^- \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$) en cuatro momentos del cultivo de arroz en experimento de campo. Las barras representan la media + el error estándar ($n=4$). Letras diferentes indican diferencias significativas por momento del cultivo de arroz y/o tipo de suelo ($p<0,05$).

El N mineral también fue significativamente mayor a la madurez del cultivo en el suelo de mayor MO ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$) y difirió entre suelos solamente en esta etapa del cultivo en el campo (Figura 7b). Como era de esperar, la mayor parte del N mineral está bajo forma de NH_4^+ en estos suelos inundados después del macollaje (Figura 7b).

En el experimento de invernáculo el N mineral fue diferente entre suelos ($p = 0,003$) y entre momentos del cultivo de arroz ($p = 0,002$) (Figura 6b). El suelo de Salto con mayor contenido de MO presentó mayor N mineral que Treinta y Tres, en promedio $25,9$ y $15,6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$, respectivamente. Fue mayor a la siembra que a primordio floral y madurez del cultivo, en promedio $27,5$ y $15,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$, respectivamente. Cuando el cultivo permanece inundado, gran parte del N se presenta como NH_4^+ . Al tratarse de cajones con suelo en el experimento en invernáculo podría considerarse que en esa etapa todo el suelo era rizósfera, lo que generó condiciones propicias para que ocurriera nitrificación.

3.1.3 Oxidación de amonio

La oxidación de NH_4^+ a NO_2^- es el primer paso de la nitrificación. En el experimento de invernáculo el suelo de Salto con mayor contenido de MO tuvo mayor actividad potencial de oxidación de NH_4^+ ($23,7$ vs $9,0 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ss d}^{-1}$ en Treinta y Tres) pero el NMP no fue diferente entre suelos (Figura 8). La actividad de oxidación de NH_4^+ fue mayor en el estadio de primordio floral en el suelo de Treinta y Tres, con suelo inundado. Recientemente, Yang et al. (2016) indicaron que los microorganismos nitrificantes estarían muy bien adaptados a condiciones reductoras del suelo, como es el caso de los suelos arroceros durante el periodo de inundación. No hubo efecto del suelo ($p = 0,6$) ni del momento del cultivo del arroz ($p = 0,10$) sobre la actividad potencial y el NMP de oxidantes de NH_4^+ en condiciones de campo (Figura 9). Se encontró una gran variabilidad entre repeticiones biológicas. Por otro lado, en la técnica de NMP se realizaron diluciones decimales, lo que no permitió encontrar diferencias entre suelos. Diluciones menores podrían haber permitido encontrar alguna diferencia.

El NMP de oxidantes de NH_4^+ estuvo en el orden de entre 10^2 a 10^5 g^{-1} ss en el experimento de invernáculo (Figura 8b) y en el orden de entre 10^2 a 10^4 g^{-1} ss en el experimento de campo (Figura 9b). Números similares fueron encontrados en arrozales tropicales y con diferentes manejos (Das y Adhya 2014). Los oxidantes de NH_4^+ son microorganismos de crecimiento lento (Kowalchuk y Stephen 2001) y solo una pequeña proporción de estos son cultivables (Smith et al. 2001). La estimación de estas poblaciones con la técnica del NMP tiene estas limitaciones y se usó a efectos de ver si existía correlación con otros de los parámetros estudiados, en cuyo caso sería una metodología mucho más económica para estimar poblaciones funcionalmente activas (Kravchenko y Yu 2006). En un estudio con los mismos suelos de este trabajo pero con técnicas independientes del cultivo, como la amplificación por qPCR del gen de la amonio monooxigenasa, Azziz et al. (2016) obtuvieron valores del orden de 10^4 a 10^6 para arqueas y 10^5 a 10^7 para bacterias oxidantes de NH_4^+ en invernáculo. Con esa metodología, las arqueas no variaron de número con el tipo de suelo pero las bacterias fueron más numerosas en el suelo de Treinta y Tres (de menor contenido de MO). El crecimiento autotrófico de las arqueas oxidantes de NH_4^+ es discutido (Wu et al. 2013), aunque en estos suelos por métodos independientes del cultivo se encontró que el número de bacterias oxidantes de NH_4^+ fue mayor que el de arqueas (Azziz et al. 2016).

La oxidación de NH_4^+ se favorece en condiciones óxicas y en presencia de NH_4^+ , por lo que en los períodos posterior a la fertilización y pre inundación, cómo a la siembra, se esperaba una gran actividad oxidante de NH_4^+ . Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los estadios, esos efectos podrían haberse diluido ya que el muestreo recogió mayor cantidad de suelo no rizosférico en esta etapa.

Glaser et al. (2010) indican que un aumento en el número de oxidantes de NH_4^+ debido a su crecimiento lento solo se percibiría unos 21 días después del aumento en la concentración de NH_4^+ . En este estudio la concentración de NH_4^+ aumentó en la cosecha en el experimento a campo (Figura 7b), por lo que un aumento en la cantidad de oxidantes podría no detectarse en los muestreos realizados. Aunque la oxidación de NH_4^+ es aeróbica, hay que considerar que a medida que avanza el ciclo

del cultivo y se inunda, también aumenta la cantidad de raíces que intercambian O₂ por el aerénquima (Briones et al. 2002). Por otra parte, Yang et al. (2016) sostienen que tanto la mineralización como la nitrificación en suelos inundables serían menos sensibles a la concentración de O₂ disponible.

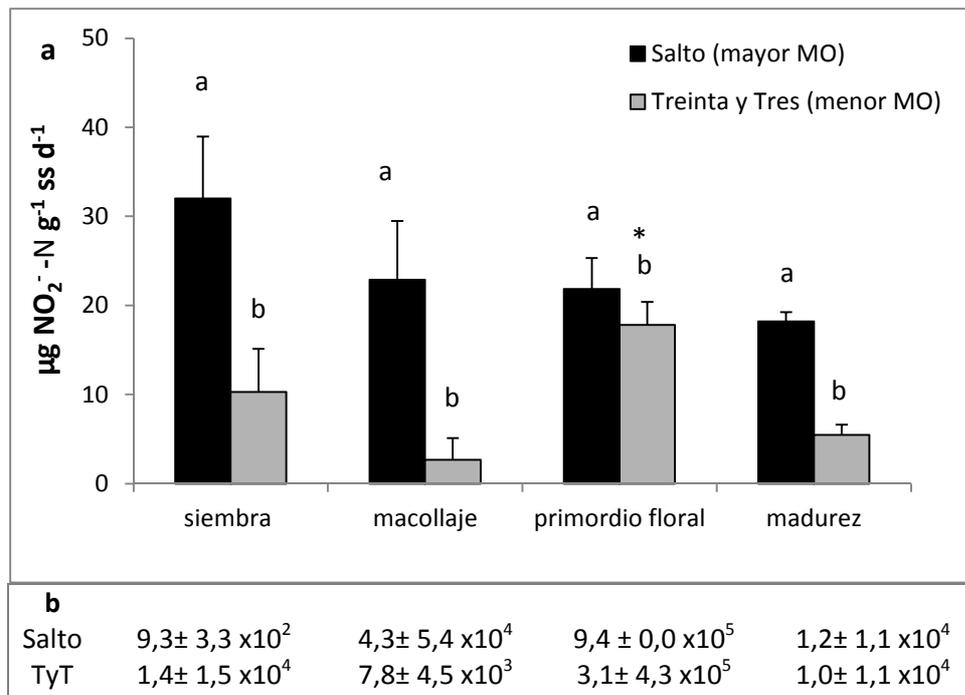


Figura 8. (a) Actividad potencial de oxidación de NH₄⁺ (µg NO₂-N g⁻¹ ss. d⁻¹) y (b) número más probable de oxidantes de NH₄⁺ g⁻¹ ss en suelo de Salto y de Treinta y Tres (TYT) en 4 momentos del cultivo de arroz, en experimento de invernáculo. Se presentan las medias + el desvío estándar (n=4). Letras diferentes indican diferencias entre suelos y el asterisco por momento del cultivo de arroz (p < 0,05).

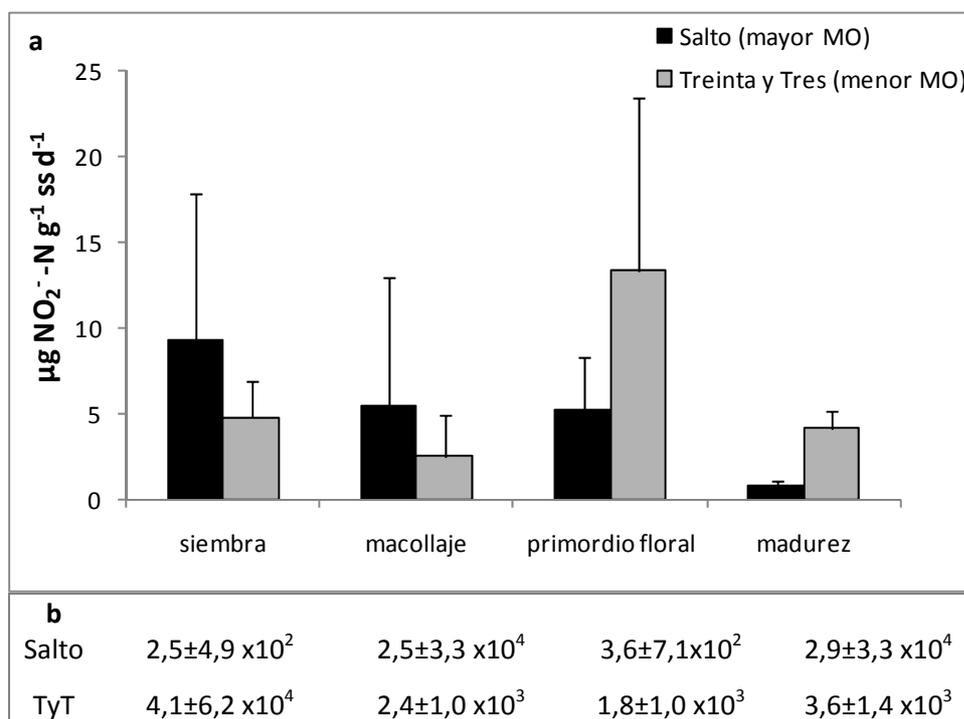


Figura 9. (a) Actividad potencial de oxidación de NH_4^+ ($\mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1} \text{ ss d}^{-1}$) y (b) número más probable de oxidantes de NH_4^+ $\text{g}^{-1} \text{ ss}$ en suelo de Salto y de Treinta y Tres (TYT) en 4 momentos del cultivo de arroz, en experimento de campo. Se presentan las medias + el desvío estándar (n=4).

3.1.4 Desnitrificación

La abundancia y actividad de los microorganismos desnitrificantes ha sido ampliamente estudiada en arrozales (Lan et al. 2015, Kögel-Knabner et al. 2010, Yoshida et al. 2009), dónde las condiciones del cultivo favorecen este proceso. En este caso, el suelo de Salto (con mayor contenido de MO) presentó mayor actividad potencial y NMP de desnitrificantes, independientemente del momento del cultivo de arroz (Figura 10). Las poblaciones en el suelo de Salto estuvieron en promedio en el orden de 10^{11} y en Treinta y Tres en el orden de 10^9 . En ambos suelos a primordio floral y madurez del cultivo las poblaciones de desnitrificantes fueron significativamente mayores que a la siembra y a macollaje. Kravchenko y Yu (2006) encontraron valores de NMP del orden de 10^6 para suelos arroceros de Arkansas, donde la forma de cultivo es parecida a la de Uruguay, mientras que los NMP fueron mas bajos en arrozales tropicales de India (Das y Adhya 2014). Contrariamente a

nuestros resultados, Kravchenko y Yu (2006) comunicaron que la actividad desnitrificante disminuyó con el contenido de carbono (C) del suelo.

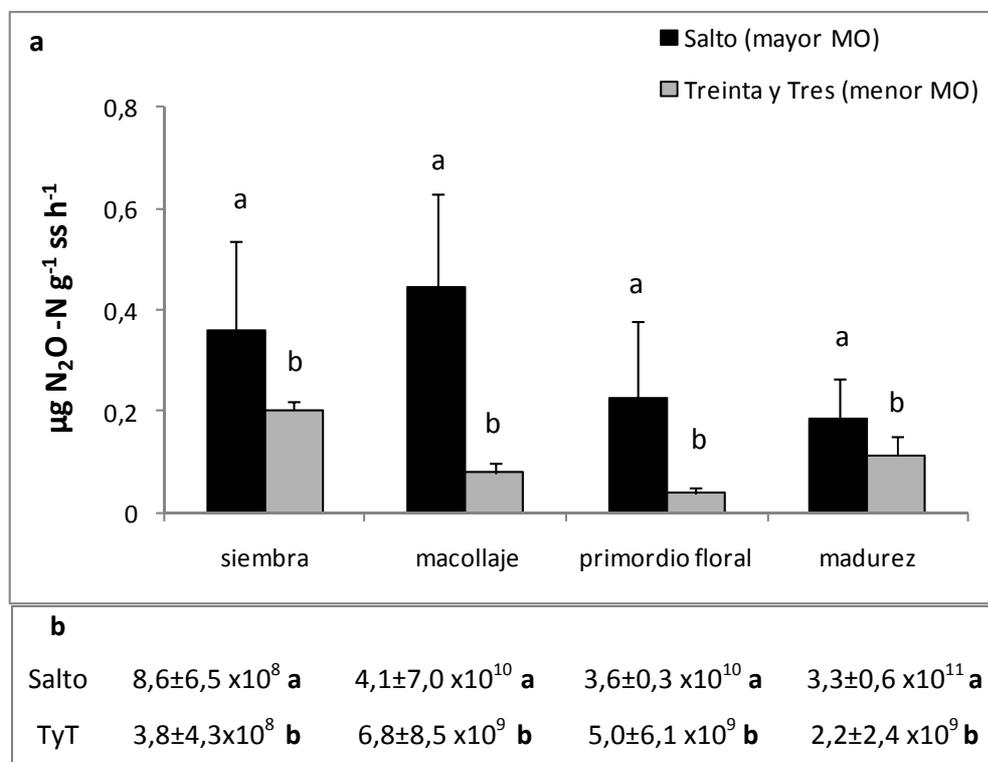


Figura 10. (a) Actividad de la enzima desnitrificante ($\mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ ss. h}^{-1}$) y (b) número más probable de desnitrificantes $\text{g}^{-1} \text{ ss}$ en: suelo de Salto y de Treinta y Tres, en 4 momentos del cultivo de arroz, en experimento de campo. Se presentan las medias + el desvío estándar ($n=4$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos ($p<0,05$).

Los desnitrificantes son microorganismos que reducen NO_3^- a compuestos gaseosos (NO , N_2O y N_2) y el NMP determinado con la técnica utilizada en este trabajo no puede distinguir entre los que realizan la reducción completa a N_2 o solo hasta N_2O .

La desnitrificación heterótrofa es afectada por la disponibilidad de fuentes de C, la concentración de NO_3^- , la disponibilidad de O_2 , el pH y la temperatura (Wallenstein et al. 2006). En este estudio se usó glucosa como fuente de C tanto para el NMP como para la actividad potencial. Si bien la mayoría de los estudios usan glucosa como fuente de C para la desnitrificación (Bergstermann et al. 2011, Cuhel et al. 2010), Heylen et al. (2006) evaluaron diferentes medios de cultivos para aislar desnitrificantes y encontraron que medios con etanol o succinato permitían aislar un

mayor número de estos organismos. Morley et al. (2014) también cuestionan el empleo de glucosa en ensayos de desnitrificación que se espera relacionar con la emisión de N_2O . Estos autores sostienen que la relación N_2/N_2O es menor cuando se usan ácidos dicarboxílicos en ensayos de desnitrificación y por otro lado estos son compuestos que secretan las raíces.

El suelo de Salto presentó mayor potencial desnitrificante que el de Treinta y Tres (0,3 vs 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ ss, $p = 0,0004$) (Figura 10). El mayor contenido de materia orgánica en el suelo de Salto podría sustentar una alta actividad desnitrificante heterótrofa. La desnitrificación no sólo se ve favorecida con altos contenidos de materia orgánica sino también por la fertilización nitrogenada y las condiciones limitantes de O_2 (Bakken et al. 2012, Mulvaney et al. 1997). En este trabajo no hubo correlación entre NMP de desnitrificantes, el potencial de desnitrificación, ni el contenido de NO_3^- del suelo (Tabla 4); aunque dado la versatilidad metabólica de los desnitrificantes, su abundancia y actividad no siempre coinciden (Yin et al. 2014).

3.2. POTENCIAL DE INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN DE CULTIVARES DE ARROZ

Se estimó el potencial BNI producido por exudados radicales de cultivares de arroz crecidos en macetas con los suelos de Salto y Treinta y Tres a través de un bioensayo con la cepa recombinante de *N. europaea*. Se observó que los exudados de ambos cultivares produjeron actividad BNI específica y que en el cv. Tacuarí (ssp. japónica) fue mayor a la producida por el cv. El Paso (ssp. índica), 354 y 209 ATU por gramo de raíz, respectivamente (valores promedio por cultivar, Figura 11). Subbarao et al. (2007a) al evaluar la actividad BNI específica en una variedad de pasturas forrajeras, cultivos de cereales, entre ellos arroz, y leguminosas, encontraron una amplia gama de actividades BNI y ninguna de las variedades de arroz evaluadas presentó actividad BNI específica (medida como ATU g^{-1} de raíz). Sin embargo, Tanaka et al. (2010) evaluaron la actividad BNI de exudados radicales de 36 genotipos de arroz y reportaron la primera evidencia de inhibición de la nitrificación producida por arroz. También encontraron que los distintos genotipos presentaban actividades BNI

contrastantes. No hubo correlación entre el porcentaje de inhibición y la subespecie de arroz (índica vs. japónica), pero sí encontraron que las variedades menos seleccionadas o aquellas crecidas sin riego (*upland*) fueron las de mayor actividad BNI y las variedades seleccionadas de mayor rendimiento crecidas en zonas bajas e irrigadas tendieron a presentar actividades BNI bajas. Recientemente, Sun et al. (2016) evaluaron la actividad BNI de 19 variedades de arroz y encontraron alta actividad BNI tanto en variedades índicas como japónicas con un porcentaje de inhibición superior al 40%. La actividad BNI expresada como porcentaje de inhibición de los cv. Tacuarí y El Paso fue $45 \pm 9 \%$ y $38 \pm 12 \%$, respectivamente, del orden de la obtenida por Sun et al. (2016). En contraposición con lo reportado anteriormente por Tanaka et al. (2010), estos cultivares de arroz crecidos en zonas bajas con riego presentaron altos porcentajes de inhibición de la nitrificación.

Ambos cultivares de arroz produjeron una inhibición menor a la de *B. humidicola* CIAT 16888. El genotipo CIAT16888 se ha caracterizado por su alta actividad BNI (Arango et al. 2014) y los valores de ATU obtenidos concuerdan con los obtenidos por Nuñez (2015). Asimismo, la inhibición no varió con el estadio de crecimiento de la planta ni por el tipo de suelo ensayado (Figura 11). Tanaka et al. (2010) comunicaron una tendencia a la disminución de la actividad BNI en plantas maduras de arroz, crecidas en hidroponia. La mayor actividad de inhibición se encontró en ese trabajo en plantas crecidas por 21 y 28 días. Sin embargo, Sun et al. (2016) encontraron que la actividad BNI aumentó de 3 a 6 semanas de crecidas las plantas. Estudios realizados por Zakir *et al.* (2008) evaluaron la BNI producida en plantas de sorgo de 14 a 49 días de crecidas en hidroponia y vieron que aumentaba con la edad de la planta. Sin embargo, Subbarao et al. (2013b) encontraron que luego de 40 días de crecidas las plantas de sorgo, la actividad BNI específica decrece. Las edades de las plantas contrastadas (32 y 56 días) y la diferencia en los sustratos de crecimiento (suelo vs hidropónico) podrían explicar porqué no se pudo observar esas diferencias.

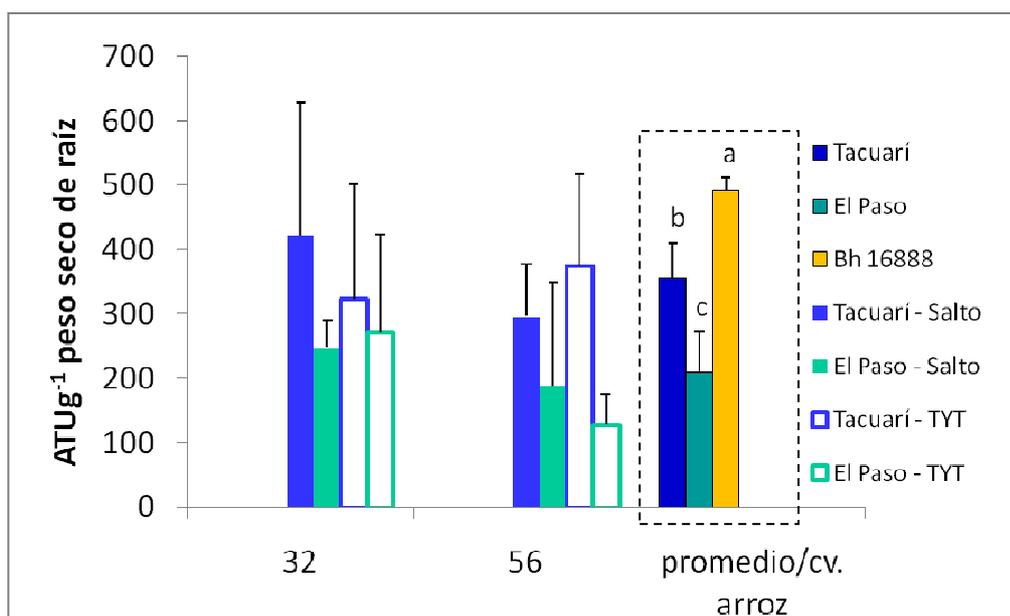


Figura 11. Inhibición biológica de la nitrificación producida por los exudados radicales de los cultivares de arroz Tacuarí y El Paso en suelos de Treinta y Tres (TYT) y Salto (ATU g⁻¹ peso seco de raíz). Se comparan dos estadios de crecimiento de las plantas, a los 32 y 56 días postsiembra. El promedio de inhibición por cultivar se comparó contra la variedad *Brachiaria humidicola* CIAT 16888. Se presentan las medias y los errores estándar (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas (p< 0,05).

El potencial BNI también ha sido evaluado a partir de compuestos contenidos en extractos de tejido de raíz (Tefamariam et al. 2014). Cuantificar el potencial BNI a partir de extractos de raíz supone una ventaja metodológica ya que se evita la rotoevaporación de grandes volúmenes de solución (como ocurre para la obtención de exudados radicales) y permite la aplicación de esta metodología a plantas de campo. Nuñez (2015) mostró que genotipos de *B. humidicola* con potencial altos, medios y bajos se mantienen con la misma tendencia, independiente de que se use para la medición de la BNI extractos provenientes de exudados o de tejido de raíz, lo que indica que posiblemente la mayoría de las moléculas inhibitorias de la nitrificación que son sintetizadas en la raíz de *Brachiaria*, son exudadas al medio. Por el contrario, Subbarao et al. (2013b) demostraron en sorgo, que existen distintos compuestos BNI segregados por los exudados (compuestos hidrofílicos) y por los extractos de tejido radical (compuestos hidrofóbicos).

En la Figura 12 se presentan los porcentajes de inhibición de la nitrificación producidos a partir de extractos de raíces de los dos cultivares de arroz y de *B. humidicola*. Se encontró una alta variabilidad entre las mediciones del bioensayo. La mayor variabilidad se obtuvo en las muestras con menor cantidad de tejido radical y las muestras con mayor cantidad de tejido presentaron mayor estabilidad entre repeticiones. Nuñez (2015) determinó que se necesitan al menos 100 mg de tejido para poder estimar el BNI producido por extractos de tejido de raíz. Si bien existe una tendencia que muestra que el cultivar Tacuarí presenta mayor inhibición que El Paso, debería repetirse el experimento con mayor cantidad de tejido para poder confirmar estos resultados.

Por otro lado, se evaluó si la actividad BNI producida por el extracto de raíz respondía al amonio, el principal estímulo que promueve la exudación de compuestos BNI (Subbarao et al. 2007b). Al comparar los extractos de raíz de 100 mg de tejido de *B. humidicola* 679 con y sin el estímulo de NH_4Cl 1mM, no se obtuvieron diferencias significativas. Sin embargo Nuñez (2015) sí encontró estas diferencias para los dos genotipos de mayor BNI, CIAT16888 y CIAT679 que produjeron mayor inhibición en presencia de amonio.

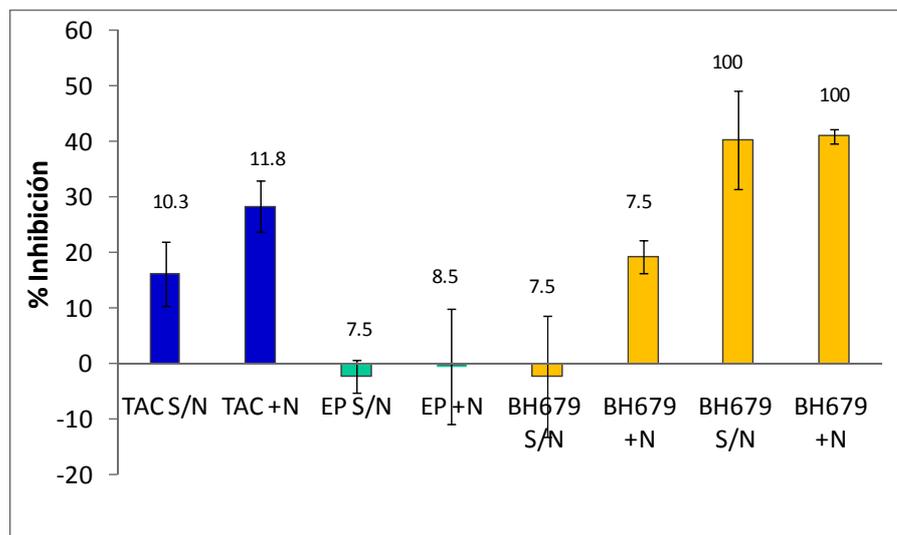


Figura 12. Inhibición biológica de la nitrificación (% inhibición) producida por extractos de raíz estimulados con NH_4Cl (+N) y sin estimular (S/N). TAC: cultivar de arroz Tacuarí, EP: cultivar El Paso, BH679: *Brachiaria humidicola* var. CIAT 679. Se presentan las medias y los errores estándar (n=4). Los números indican los mg de tejido de raíz utilizados.

3.3. INHIBICIÓN DE LA NITRIFICACIÓN SOBRE EL SUELO

Para validar la inhibición de la nitrificación producida por los exudados de los cultivares de arroz en el bioensayo de luminiscencia, se procedió a incubar los exudados concentrados de los cultivares de arroz con suelos.

En un primer experimento se consideró medir el contenido de amonio y nitrato (sustrato y producto de la nitrificación) a los 7 y 14 días de incubación de los suelos de Salto y Treinta y Tres (Figura 13). Hubo interacción entre el tiempo de incubación y el tratamiento aplicado al suelo. El NH_4^+ fue mayor en los suelos con exudados de arroz y aumentó con el tiempo de incubación en ambos suelos. Este hecho podría deberse a que parte del NH_4Cl que se utilizó para estimular la exudación de compuestos BNI permaneció en las muestras. Tanaka et al. (2010) encontraron que en los exudados permanece un 48% del NH_4^+ contenido en la solución de captura de estos. Asimismo, los compuestos exudados por las raíces podrían producir un efecto estimulador de la actividad y crecimiento de la microbiota del suelo que conlleva la producción de exoenzimas microbianas capaces de mineralizar el N de la materia orgánica más compleja, fenómeno conocido como *efecto priming* (Paterson 2003).

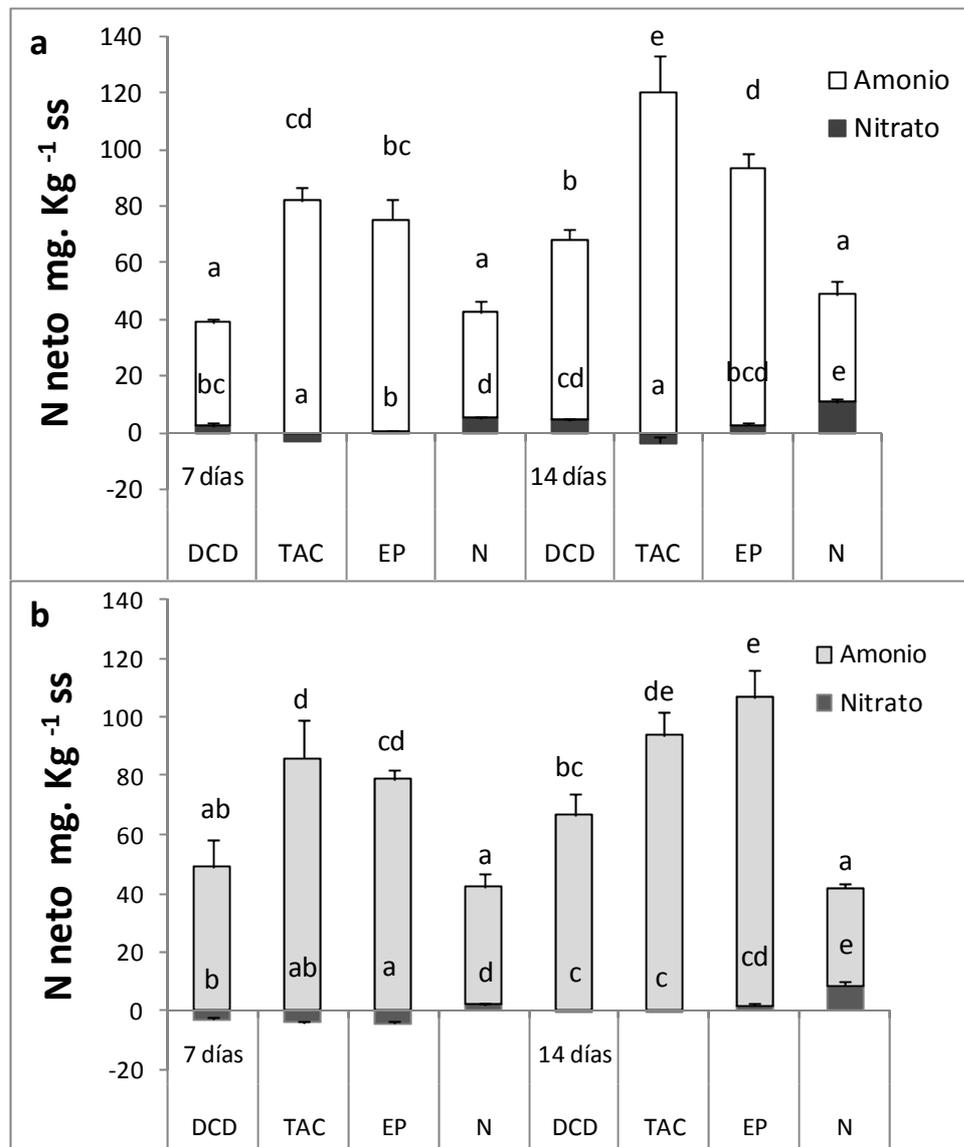


Figura 13. Contenido neto de amonio y nitrato ($N-NH_4^+$ y $N-NO_3^-$ mg. Kg^{-1} suelo seco) a los 7 y 14 días de incubación de los suelos de Salto (a) y Treinta y Tres (b) con: Nitrógeno (N); N + dicianidamida (DCD); N + exudado del cultivar Tacuarí (TAC); N + exudado del cultivar El Paso (EP). Se presentan las medias y errores estándar (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para amonio o nitrato.

El NO_3^- fue menor en los suelos con exudados de arroz y se mantuvo o disminuyó con el tiempo de incubación (figura 13). En el suelo de Salto, el tratamiento con exudado de Tacuarí produjo menos NO_3^- que el tratamiento con el exudado de El Paso y que con el inhibidor sintético de la nitrificación DCD. Sin embargo, en Treinta y Tres no hubo diferencias entre cultivares de arroz para el contenido de

NO_3^- ni de NH_4^+ . Por otro lado, el tratamiento con nitrógeno fue el de mayor contenido de NO_3^- y menor de NH_4^+ . Esto era esperable, ya que agregado de nitrógeno como NH_4^+ a saturación al suelo favorece la nitrificación, y por lo tanto, la conversión de NH_4^+ en NO_3^- .

En la figura 14 se presenta el porcentaje de inhibición de la nitrificación producido por los exudados en los suelos de Salto y Treinta y Tres a los 14 días de incubados. Los exudados del cv. Tacuarí en ambos suelos producen inhibición de la nitrificación igual a la producida por el inhibidor sintético DCD. En el suelo de Salto, el tratamiento con exudados de El Paso también produjo inhibición igual a la producida por DCD, pero esta fue menor a la producida por Tacuarí, 34 y 72 %, respectivamente. De esta manera, se valida el efecto del cultivar obtenido en el bioensayo. En Treinta y Tres, si bien el tratamiento con exudado de Tacuarí inhibió más del doble que el tratamiento El Paso, las diferencias no fueron significativas. Habría una tendencia que indica que en el suelo de Salto el efecto del agregado de exudados de ambos cultivares produce mayor inhibición que en de Treinta y Tres. Esta diferencia fue significativa entre suelos solamente para el tratamiento con exudados de El Paso que produjo una inhibición casi 3 veces mayor en Salto que en Treinta y Tres. Se ha observado que la efectividad en la inhibición de la nitrificación varía con el tipo de suelo y resulta más efectiva en suelos con texturas livianas y bajos contenidos de MO (Subbarao et al. 2006a). Aunque estos suelos no son muy diferentes texturalmente, sí lo son en cuanto al contenido de MO (Tabla 1). Los resultados obtenidos indicarían una mayor expresión del potencial BNI en el suelo de mayor contenido de MO, contrariamente a lo reportado por Subbarao et al. (2006a).

En ambos suelos DCD produjo una inhibición promedio de 44%. El DCD es un inhibidor de la enzima *amoA* (Liu et al. 2014), ampliamente utilizado para reducir las tasas de nitrificación y así disminuir las pérdidas de N del suelo y mejorar el uso eficiente del N para los cultivos (Liu et al. 2013). Se ha reportado una inhibición por DCD de más de 99% de la actividad nitrificante en ensayos de incubación con suelos (Nuñez 2015, Zhang et al. 2012, Gopalakrishnan et al. 2009), si bien la efectividad depende entre otros factores, de las propiedades del suelo (humedad, pH, C orgánico,

N mineral y el tipo de arcilla) (McGeough et al. 2016, Shepherd et al. 2012, Barth et al. 2001).

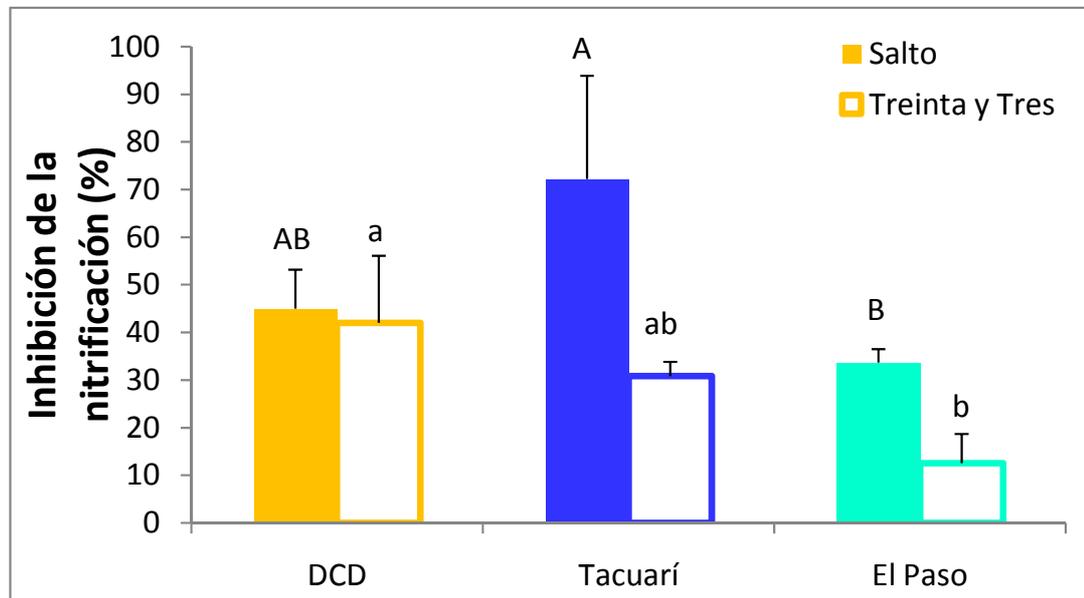


Figura 14. Inhibición de la nitrificación (%) de los suelos de Salto y Treinta y Tres producida por exudados del cultivar Tacuarí, exudados del cultivar El Paso y diciandiamida (DCD) de 7 a 14 días de incubación. Se presentan las medias y errores estándar (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos analizados para cada suelo (p< 0,05).

En un segundo experimento se consideró probar dos dosis del inhibidor sintético DCD mediante un nuevo sistema de incubación de suelos para lograr mayor inhibición y por otro lado, conocer la dinámica de la nitrificación basal de los suelos en estudio. Se determinó la producción de NO_3^- durante 10 días de incubación (Figura 15). A partir de los 4 días en el suelo de Treinta y Tres los tratamientos con DCD y con nitrógeno se diferenciaron y en Salto esto ocurrió a partir de los 6 días. Asimismo, en Salto con una dosis de DCD de 10% la nitrificación continúa en aumento, aunque con una pendiente menor a la del tratamiento con nitrógeno (Figura 16). Con la dosis de DCD 20% se logró mantener los niveles de NO_3^- similares a los basales y la pendiente difirió significativamente de la dosis 10%. Al expresar la inhibición como porcentaje de inhibición de la nitrificación se obtuvo con una dosis del 20% de DCD un promedio de 76% para ambos suelos.

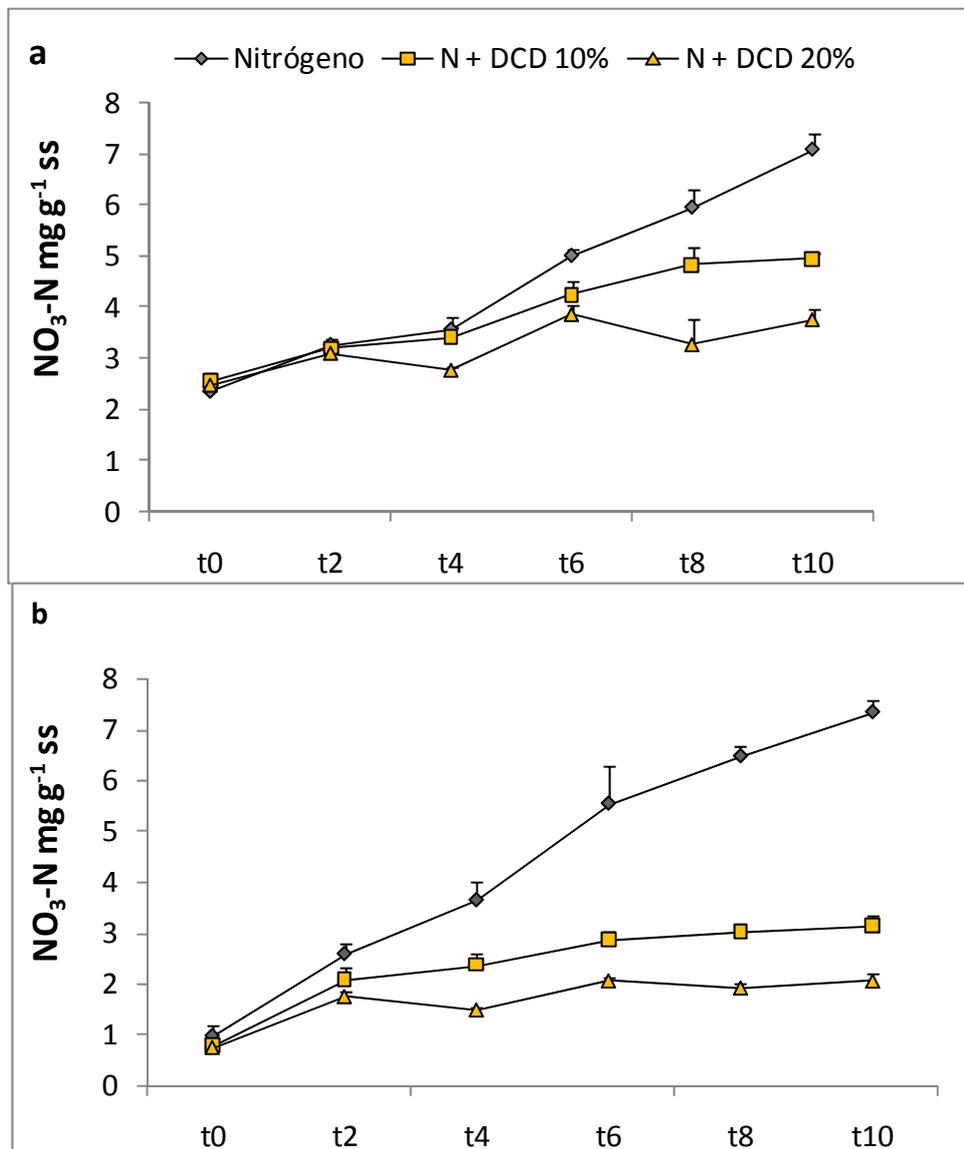


Figura 15. Producción de nitrato (N-NO_3^- mg.kg^{-1} suelo seco) durante 10 días de incubación de los suelos de Salto (a) y Treinta y Tres (b) con Nitrógeno (N) y N + dicianidamida (DCD) 10% o 20%. Cada punto es el promedio de 3 repeticiones más los errores estándar.

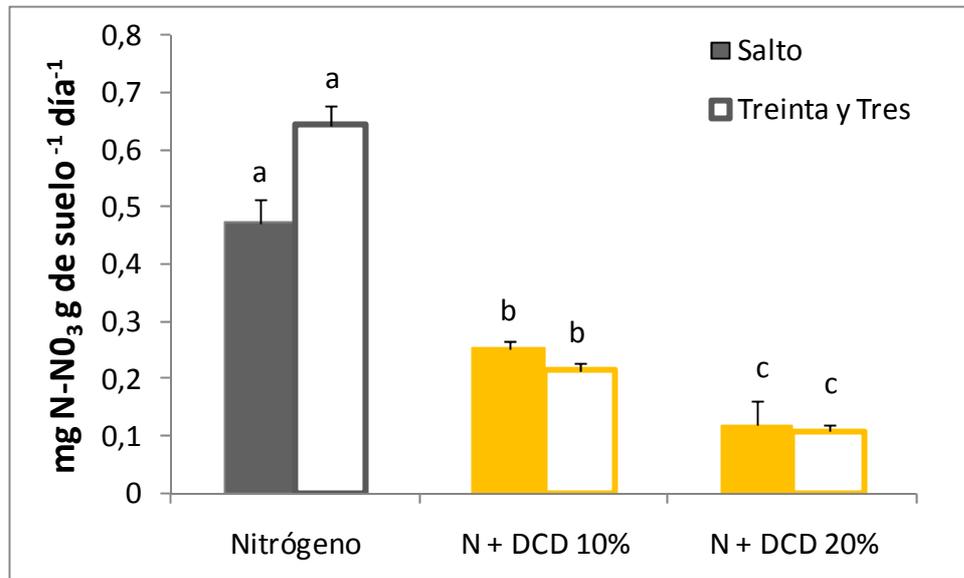


Figura 16. Tasas de nitrificación de los suelos de Salto y Treinta y Tres, comparadas entre los tratamientos de Nitrógeno (N) y N + dicianidamida (DCD) 10% o 20%. Se presentan las medias y errores estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos analizados para cada suelo ($p < 0,05$).

Luego de la estandarización de la dosis del inhibidor y el tiempo de incubación de los suelos, se procedió a repetir el experimento con la incorporación de la solución trampa (solución de NH_4Cl de captura de los exudados) como control y se determinó el porcentaje de inhibición de la nitrificación producida en los suelos luego de 12 días de incubados (Figura 17).

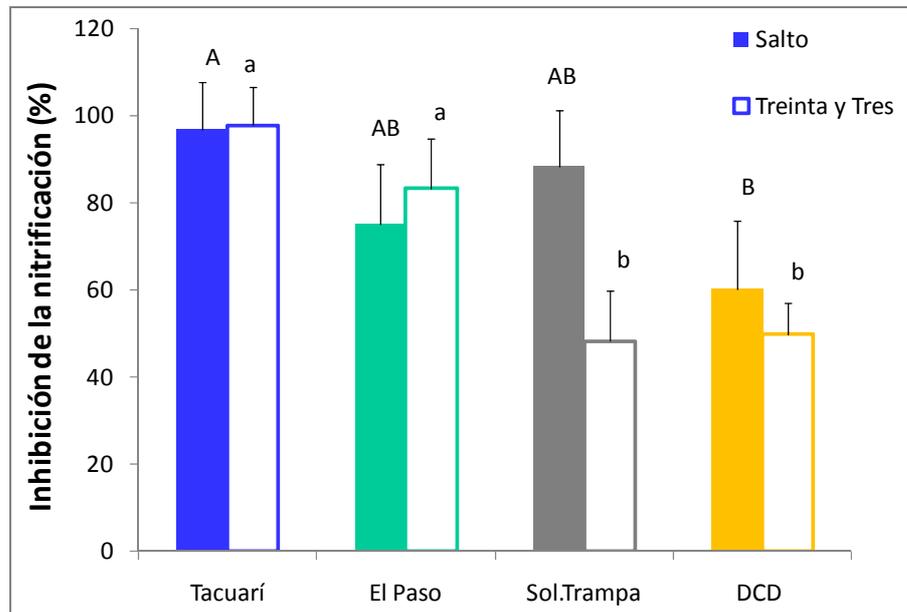


Figura 17. Inhibición de la nitrificación (%) de los suelos de Salto y Treinta y Tres producida por exudados del cultivar Tacuarí, exudados del cultivar El Paso, solución de captura de los exudados (Sol. Trampa) y diciandiamida (DCD) a los 12 días de incubación. Se presentan las medias y errores estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos analizados por suelos ($p < 0,05$).

Los exudados de los cultivares de arroz Tacuarí y El Paso produjeron inhibición de la nitrificación significativamente mayor a la producida por el control con la solución trampa, en el suelo de Treinta y Tres. La inhibición neta fue de 50 y 35 % para exudados de Tacuarí y El Paso respectivamente, pero no fue diferente entre cultivares.

En el suelo de Salto la inhibición producida por los exudados de arroz fue igual a la producida por el control. Esto evidenció un efecto BNI inespecífico probablemente producido por la alta concentración de sales presente en la solución trampa, como han sugerido Tanaka et al. (2010) y Sun et al. (2016). Subbarao et al. (2006a) propusieron que al resuspender los exudados concentrados en metOH y luego en agua bidestilada se elimina el exceso de cloro presente en la solución de captura, que puede interferir con el bioensayo. Sin embargo, Tanaka et al. (2010) reportaron que los exudados concentrados del genotipo IAC25 tuvieron una conductividad eléctrica (Ce) de $1,2 \text{ mS cm}^{-1}$, que atribuyeron al NH_4Cl remanente en la solución trampa. Al incubar un suelo con soluciones con un rango de Ces, encontraron efecto BNI luego

de 7 días de incubación del suelo con 1 y 2 mS cm⁻¹. Aún así, el efecto BNI de los exudados de IAC25 fue mayor, lo que indicó que existió un efecto BNI, como ocurrió también en este estudio en el suelo de Treinta y Tres. Gopalakrishnan et al. (2009) propusieron un método de remoción de las sales inorgánicas consistente en pasar los exudados concentrados previa dilución en agua por una columna de fase sólida *cartridge*. Al remover las sales inorgánicas mediante este método podría evitarse el efecto de BNI inespecífico.

La alta actividad BNI demostrada en el bioensayo en plantas de *Brachiaria* y arroz ha sido confirmada a través de la supresión de la nitrificación en el suelo mediante ensayos de incubación con exudados y NH₄⁺ (Tanaka et al. 2010, Gopalakrishnan et al. 2009, Subbarao et al. 2006b). Aún así, el efecto inhibitorio resultó transitorio y se requirió una cantidad de compuestos BNI mayor a 5 ATUg⁻¹ de suelo (Tanaka et al. 2010, Subbarao et al. 2006b). En sorgo, los compuestos BNI exudados de las raíces suprimieron de forma moderada la nitrificación del suelo (≤40 % inhibición) y se requirió al menos 10 ATUg⁻¹ de suelo para lograr la inhibición. Aún aumentando la concentración de exudados no se vio un mayor efecto inhibitorio de la nitrificación del suelo (Subbarao et al. 2013b). Sin embargo, los exudados radicales de la planta silvestre *Leymus racemosus* (Lam.) Tzvelev pariente del trigo, suprimieron la nitrificación por más de 60 días (Subbarao et al. 2007c).

Existe una tendencia que indica que los genotipos con alto BNI están mayormente adaptados a sistemas de producción con bajos niveles de N, mientras que genotipos con BNI bajo se adaptan a ambientes con alta disponibilidad de N (Subbarao et al. 2013a). La inhibición de la nitrificación podría ser un mecanismo adaptativo para conservar el uso eficiente del N en sistemas naturales con bajos niveles de N, actuando como motor en la evolución de la capacidad BNI (Subbarao et al. 2013a). Por otro lado, se ha visto que los genotipos vegetales menos seleccionados (*wild*) presentan BNI más alto (Tanaka et al. 2010, Subbarao et al. 2007c).

En este trabajo no se observaron diferencias en la inhibición de la nitrificación del suelo producida entre los exudados de Tacuarí y El Paso, como había ocurrido en el bioensayo. Subbarao et al. (2012) indicaron que no todas las moléculas que presentan

actividad BNI a través del bioensayo, también manifiestan una inhibición de la nitrificación en el suelo. Entre otras razones, la variabilidad de las poblaciones nativas de AOB entre suelos puede hacer que la actividad BNI resulte inefectiva en ciertos suelos, ya que en el bioensayo se emplea una única cepa de *N. europaea*. También las propiedades físicas y químicas de los suelos pueden interferir con las moléculas BNI (Subbarao et al. 2012). Tal es el caso de la sakuratenina, un compuesto orgánico exudado por el sorgo, que en el bioensayo presentó una alta actividad BNI pero resultó inefectiva en el suelo (Subbarao et al. 2013b). También se ha visto, que los suelos alcalinos no son indicados para la expresión del BNI de plantas de sorgo y se sugiere que suelos con textura liviana, bajo poder buffer y levemente ácidos podrían ser más adecuados para explorar la actividad BNI (Subbarao et al. 2013b). Ipinmoroti et al. (2008) sugirieron que en suelos con alto contenido de MO, la matriz de compuestos orgánicos podría interferir en la inhibición de la nitrificación, como ocurrió en el caso de un suelo Andosol en respuesta a los exudados de *B. humidicola*.

Sería necesario caracterizar las moléculas exudadas por los genotipos de arroz y así poder profundizar en los mecanismos por los cuales estos inhiben la nitrificación. Estos mecanismos han sido dilucidados en *Brachiaria* y en sorgo para las moléculas brachialactona y MHPP, sakuratenina y sorgolenona, respectivamente, capaces de bloquear las enzimas AMO y HAO (Subbarao et al. 2013b, 2009, Zakir et al. 2008). Recientemente se descubrió en arroz una molécula capaz de competir por el sitio activo de la enzima *amoA* y así inhibir la nitrificación. Esta molécula resultó ser 1,9-decanediol, presente en los exudados de la mayoría de las variedades de arroz evaluadas con alta BNI (Sun et al. 2016). Además este estudio demostró, a través de un experimento con ^{15}N , que las variedades de arroz con alta BNI fueron más eficientes en la utilización de NH_4^+ y prefirieron este sobre el NO_3^- .

El inhibidor DCD produjo una inhibición de 50 y 60% para Treinta y Tres y Salto, respectivamente, menor a la producida en la estandarización. Esta disminución de la efectividad del inhibidor no era esperable ya que se utilizaron los mismos suelos y las mismas condiciones experimentales. La inhibición de la nitrificación producida

por DCD ha sido bien estudiada en *Nitrosomonas* (Liu et al. 2014), pero su efectividad puede variar con las distintas poblaciones de nitrificantes (Subbarao et al. 2013a). Liu et al. (2013) encontraron que las comunidades microbianas oxidantes del NH_4^+ de dos tipos de suelo respondieron diferente al DCD, pero hasta el momento esta diferencia resulta poco entendida. Un estudio realizado en condiciones controladas en suelo con el agregado de urea bovina y DCD sugiere que hay una mínima respuesta metabólica de AOA a DCD (O'Callaghan et al. 2010) y en condiciones de campo se ha visto que el DCD inhibe las AOB más que las AOA (Dai et al. 2013). Además Di et al. (2009) estudiaron el efecto de DCD y urea en seis suelos bajo pastura y encontraron que en algunos de estos suelos las tasas de nitrificación se redujeron parcialmente en respuesta al DCD, lo que sugiere que otros microorganismos podrían ser los principales responsables de la nitrificación en esas condiciones. Tal es el caso de los microorganismos capaces de realizar nitrificación heterótrofa. Este proceso está ampliamente distribuido entre los taxones de bacterias y hongos que pueden oxidar el amonio o reducir formas orgánicas de N a hidroxilamina, nitrito o nitrato (Hayatsu et al., 2008) y se ha indicado como proceso dominante en suelos ácidos forestales y en pastizales (van Groenigen et al. 2015).

3.3.1 Cuantificación de arqueas y bacterias nitrificantes del suelo

Estudios previos demostraron que la actividad BNI de exudados radicales sobre el suelo produce una disminución en las tasas de nitrificación y en las poblaciones de nitrificantes y que se afectan específicamente estas poblaciones y no a otros microorganismos del suelo (Gopalakrishnan et al. 2009, Subbarao et al. 2009). En este trabajo se cuantificó la abundancia del gen *amoA* de arqueas y bacterias de los suelos de Salto y Treinta y Tres incubados por 12 días en presencia de exudados de los cv. de arroz El Paso y Tacuarí.

Ninguno de los tratamientos agregados a los suelos produjo diferencias en la abundancia del gen *amoA* de arqueas (figura 18). Por lo tanto, no hubo efecto inhibitorio de los exudados de los cv. de arroz ni el inhibidor sintético DCD sobre la abundancia de AOA. En un estudio en condiciones de campo, Subbarao et al. (2009) encontraron una disminución en las poblaciones de AOB en aquellas parcelas

cultivadas con variedades de *Brachiaria*, sin embargo, no pudieron atribuir la disminución en las poblaciones de AOA a la inhibición específica de estas variedades. Recientemente, en un trabajo donde se contrastaron genotipos de *Brachiaria* con alto y bajo BNI se encontró que conforme el potencial BNI aumenta, se observa una tendencia a la reducción de arqueas, lo que confirma que el efecto BNI de *Brachiaria* tiene un impacto en la reducción de las tasas de nitrificación y en la abundancia de AOA (Nuñez 2015). Otros autores (Nardi et al. 2013) encontraron que en un suelo incubado durante 7 días con MHPP (compuesto exudado por las raíces de sorgo), el número de copias de AOA se mantuvo estable o decreció ligeramente.

DCD tiene un efecto bacteriostático más que bactericida (Amberger 1989) y su efecto inhibitorio sobre la abundancia de AOA no es claro. Se ha reportado que la población y actividad de AOB se redujo por efecto del DCD (Guo et al. 2014, Di et al. 2010), mientras que AOA no mostró respuesta alguna (Guo et al. 2014, O'Callaghan et al. 2010). Al evaluar el efecto del inhibidor sintético 3,4-dimetil pirozol fosfato (DMPP), solo la abundancia de las bacterias oxidantes del amonio se vio afectada, mientras que las arqueas se mantuvieron incambiadas (Kleineidam et al. 2011). Por otro lado, el agregado de N al suelo no produjo aumento en la abundancia de AOA. Varios autores reportan que la abundancia ni la actividad de AOA aumentan con la aplicación de amonio (Dai et al. 2013, Verhamme et al. 2011, Di et al. 2010, 2009). Se ha propuesto que las AOA son más estables y responderían menos a cambios ambientales que las AOB, por lo que podrían estar adaptadas a una amplia gama de condiciones y tener una gran versatilidad metabólica (Hai et al. 2009, Francis et al. 2005).

El número de copias del gen *amoA* de arqueas fue diferente entre suelos ($p < 0,0001$) y entre los 0 y 12 días de incubación ($p < 0,01$). Estuvo en el orden de $1,5 \times 10^7$ y $3,2 \times 10^7$ en el suelo de Salto y $1,1 \times 10^6$ y $3,3 \times 10^6$ en el suelo de Treinta y Tres, a los 0 y 12 días de incubación respectivamente (Figura 18). En los mismos suelos bajo cultivo de arroz, Azziz et al. (2016) no encontraron diferencias entre suelos. Estos autores reportaron un rango en el número de copias desde $8,2 \times 10^4$ a 1.6×10^6 por

gramo de suelo seco. El número de copias está entre los órdenes obtenidos por Leininger et al. (2006) que investigaron la abundancia de AOA en 12 tipos de suelos.

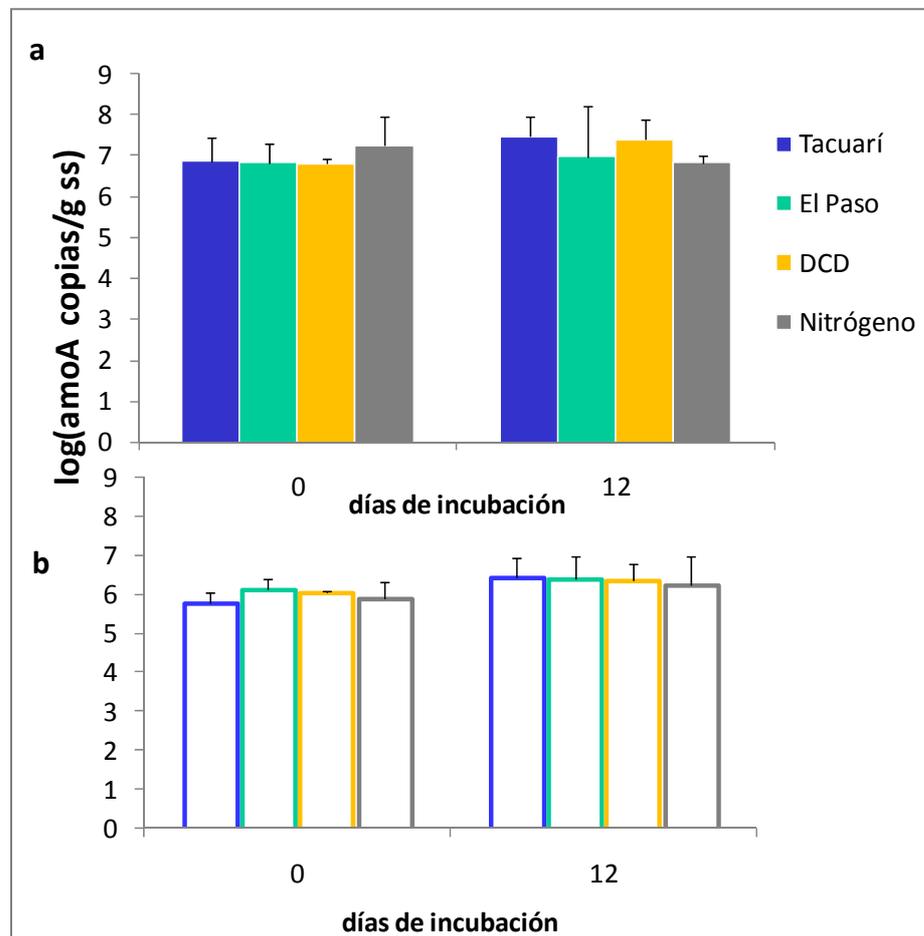


Figura 18. Abundancia del gen *amoA* de arqueas (log *amoA* copias/g suelo seco) a los 0 y 12 días de incubación de los suelos de (a) Salto y (b) Treinta y Tres con: exudado del cultivar Tacuarí, exudado del cultivar El Paso, DCD (diciandiamida) y Nitrógeno ((NH₄)₂SO₄ 27 Mm). Se presentan las medias y errores estándar (n=3).

Para la cuantificación del gen *amoA* de bacterias se realizaron 13 corridas de qPCR de las cuales solo dos cumplieron con los parámetros de eficiencia y correlación de los estándares establecidos (figuras 19 a 21). Si bien se logró optimizar los ciclos de temperatura para lograr la amplificación de este gen, la reproducibilidad de la técnica resultó baja. Las dificultades en la cuantificación de este gen fueron por falta de amplificación o por estar en el orden del límite de detección de la técnica. La inhibición de la amplificación y baja expresión de la luminiscencia en muestras de suelo ha sido frecuentemente reportada, atribuida entre otros, a la inhibición

producida por los ácidos húmicos, materia orgánica y contenido de arcilla de los suelos (Saleh-Lakha et al. 2005, Opel et al. 2009). Por otro lado, la amplificación para una concentración de molde del estándar por debajo de $3,8 \times 10^2$ copias μL^{-1} no fue satisfactoria. Para evitar una posible degradación del estándar del gen *amoA* de *N.europaea*, se volvió a amplificar el inserto con los primers del plásmido pJET1.2/blunt y se realizaron alícuotas de a 2 μL para utilizar una por cada corrida, sin mejoras en la amplificación. También se utilizó el kit *Rotor-Gene SYBR Green PCR* para descartar una posible inestabilidad del kit *Quanti Nova SYBR Green PCR* y tampoco se logró amplificación. Azzíz et al. (2016) propusieron la utilización de otro kit de master mix para lograr amplificar este gen.

Las muestras que se lograron amplificar corresponden al tiempo cero de incubación de los suelos con las soluciones. El número de copias del gen *amoA* de bacterias fue en promedio $3,8 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ y $1,4 \times 10^4 \pm 5,3 \times 10^3$, para los suelos de Salto y Treinta y Tres, respectivamente. Azziz et al. (2016), en los mismos suelos, encontraron que el número de copias del gen *amoA* de bacterias varió entre $9,4 \times 10^4$ y $3,9 \times 10^6$.

Las arqueas serían dominantes sobre las bacterias en estos suelos, como reportan varios estudios en suelos arroceros (Wang et al. 2014, Chen et al. 2011, 2010). En suelos ácidos las arqueas jugarían un rol principal en la nitrificación (Zheng et al., 2012) llegando a superar hasta en 2400 veces a las bacterias (Chen et al. 2011).

La información del efecto de los exudados de estos cultivares de arroz sobre la abundancia de AOB sería importante para validar el efecto inhibitorio de la nitrificación obtenido en condiciones in vitro. En un estudio de microcosmos con un suelo tipo Andosol y exudados de *B. humudicola*, Ishikawa et al. (2003) comprobaron supresión de la nitrificación y una disminución de la población de AOB. Gopalakrishnan et al. (2009) también encontraron menores poblaciones de AOB en un suelo Cambisol incubado con exudados radicales de *B. humudicola*, pero no en un suelo Andosol. Estos estudios demuestran que el efecto inhibitorio de los exudados radicales sobre estas poblaciones de bacterias oxidantes de NH_4^+ depende en gran medida del tipo de suelo. Conocer la actividad de estos microorganismos, por

ejemplo, mediante el estudio de la actividad transcripcional del gen *amoA* sería clave para probar la inhibición.

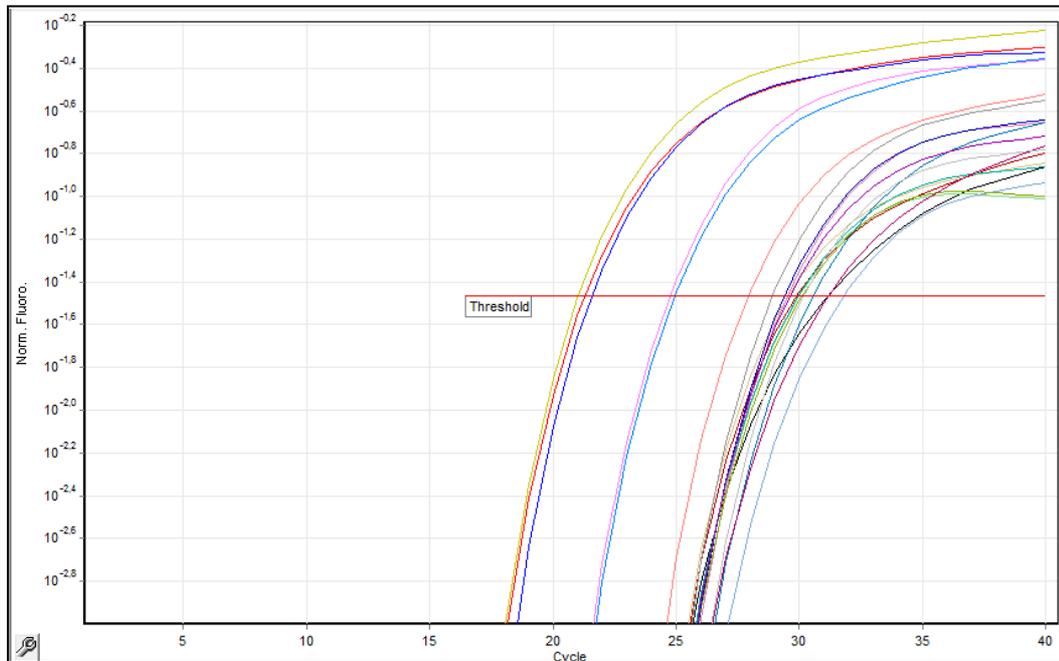


Figura 19. Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen *amoA* de *N. europaea* (construida a partir de 4 diluciones seriadas de pDNA) y muestras de ADN del gen *amoA* en poblaciones de bacterias del suelo.

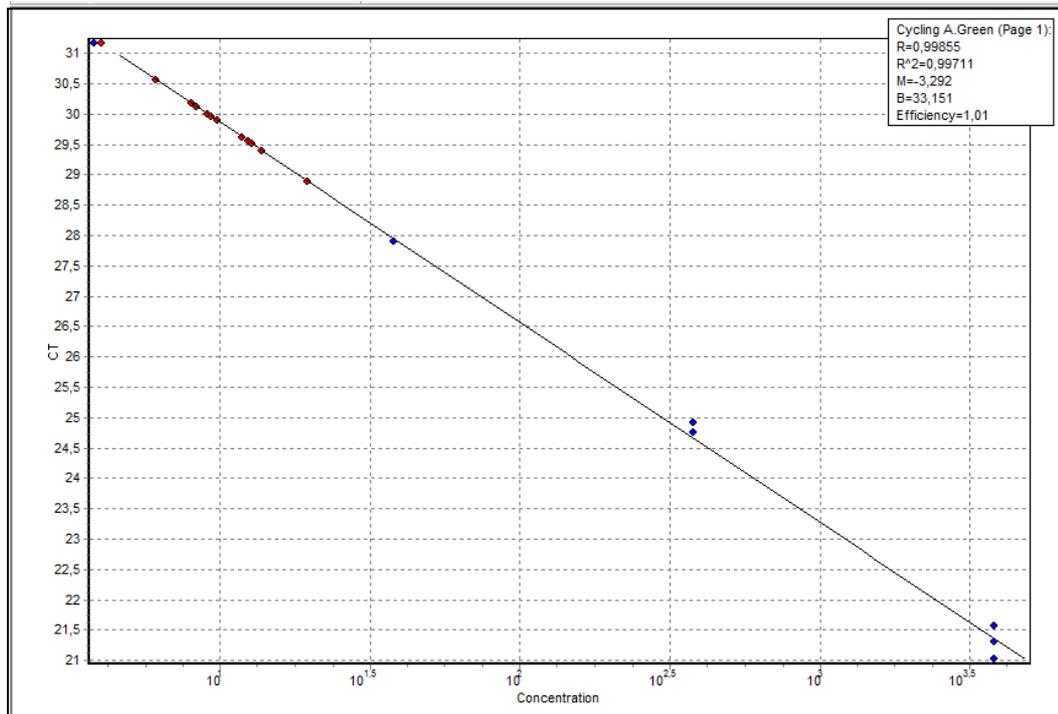


Figura 20. Regresión lineal de los valores de *cycle threshold* (Ct) vs la concentración (número de copias) de la curva estándar del gen *amoA* de *N. europaea* en azul y muestras de DNA del gen *amoA* en poblaciones de bacterias del suelo en rojo.

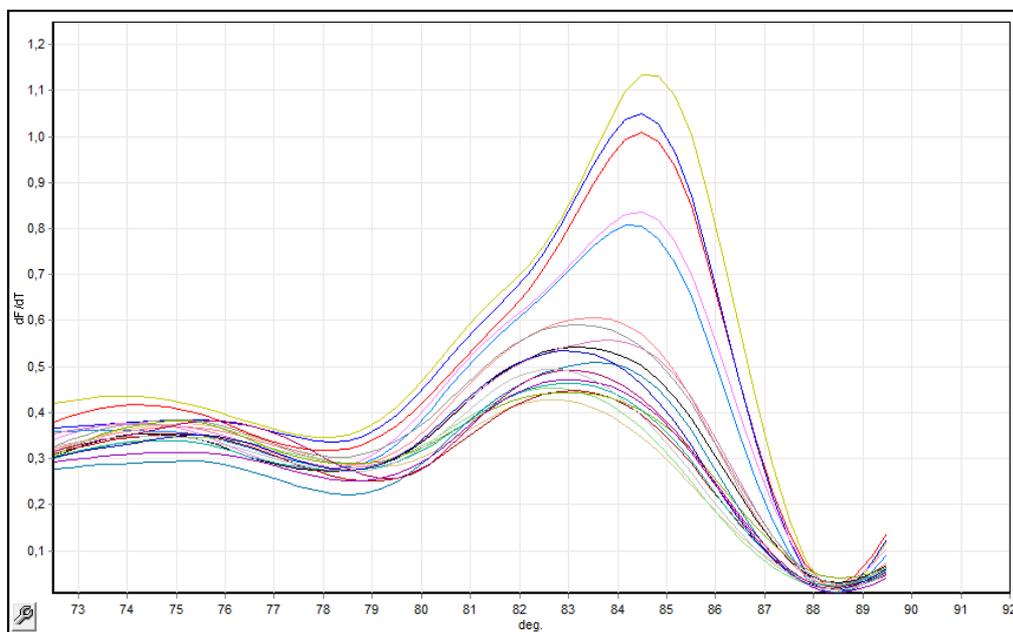


Figura 21. Curva de disociación del estándar *amoA* de *N.europaea* y muestras de DNA del gen *amoA* en poblaciones de bacterias del suelo a través de qPCR.

4. CONCLUSIONES

El suelo de Salto, con mayor MO, presentó un mayor potencial de desnitrificación y NMP de desnitrificantes (resultados de campo) y mayor potencial de oxidación de NH_4^+ y N mineral (resultados de invernáculo) que el de Treinta y Tres. Ese suelo fue el único que presentó un pico de N_2O a la madurez del cultivo que coincidió con un mayor PMN y contenido de N mineral. El NMP de desnitrificantes fue un buen indicador de su actividad potencial y a su vez correlacionó con los flujos de N_2O . Las correlaciones entre los parámetros microbianos y la emisión de N_2O podrían ser útiles para la modelación de los flujos de este gas en el cultivo de arroz.

Este trabajo deja planteadas las diferencias en la emisión de N_2O para los dos tipos de suelos representativos de los principales lugares de producción de arroz en Uruguay. Si bien los estudios de emisiones de gases de efecto invernadero se han concentrado en la zona este, tradicional para el cultivo de arroz, el suelo de Salto tendría un comportamiento diferente por lo que mayor información contribuiría en la elaboración del inventario nacional de GEI y el diseño de estrategias de mitigación de las emisiones para uno de los principales cultivos de exportación de Uruguay.

La actividad BNI específica producida por exudados de arroz de los cv. INIA Tacuarí y El Paso L144 fue más baja que la producida por *B. humidicola*. El cultivar Tacuarí presentó mayor actividad BNI específica que El Paso y no varió con el tipo de suelo o la edad de la planta.

La actividad BNI de los exudados de arroz sobre el suelo se comprobó únicamente en el suelo de Treinta y Tres y fue mayor a la producida por el inhibidor sintético DCD. El número de copias del gen *amoA* de arqueas fue menor en Treinta y Tres que en Salto y no varió con el agregado de exudados.

Determinar la actividad BNI de exudados radicales es un primer paso en el análisis del potencial BNI de un cultivar, que debe complementarse con la comprobación de la supresión de la nitrificación del suelo y su efecto sobre la actividad y abundancia de los microorganismos nitrificantes y posterior identificación y caracterización de las moléculas responsables. La diferencia de actividad BNI entre cultivares hace

promisoria la selección de aquellos con mayor capacidad de inhibición de la nitrificación para intentar regular la dinámica del N en suelos arroceros.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz). 2015. [En línea]. 6 de julio de 2015. Disponible en: <http://www.aca.com.uy/datos-estadísticos>
- Adviento-Borbe MA, Padilla GN, Pittelkow CM, Simmonds M, van Kessel C, Linnquist B. 2015. Methane and nitrous oxide emissions from flooded rice systems following the end-of-season drain. *Journal of Environmental Quality* 44 (4): 1071-1079.
- Alef K, Nannipieri P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press. 576.
- Amberger A. 1989. Research on dicyandiamide as a nitrification inhibitor and future outlook. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 20 (19-20): 1933-1955.
- Ando H, Aragones RC, Wada G. 1992. Mineralization pattern of soil organic N of several soils in the tropics. *Soil Science and Plant Nutrition* 38 (2): 227-234.
- Arango J, Moreta D, Núñez J, Hartmann K, Domínguez M, Ishitani M, ... Rao I. 2014. Developing methods to evaluate phenotypic variability in biological nitrification inhibition (BNI) capacity of *Brachiaria* grasses. *Tropical Grasslands-Forrajeros Tropicales* 2 (1): 6-8.
- Aulakh MS, Wassmann R, Bueno C, Rennenberg H. 2001. Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. *Plant and Soil* 230 (1): 77-86.
- Azziz G, Trasante T, Monza J, Irisarri P. 2016. The effect of soil type, rice cultivar and water management on ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations. *Applied Soil Ecology* 100: 8-17.
- Bakken LR, Bergaust L, Liu B, Frostegård Å. 2012. Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1593): 1226-1234.

- Barth G, Von Tucher S, Schmidhalter U. 2001. Influence of soil parameters on the effect of 3, 4-dimethylpyrazole-phosphate as a nitrification inhibitor. *Biology and Fertility of Soils* 34 (2): 98-102.
- Baudoin E, Benizri E, Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35 (9): 1183-1192.
- Belser LW, Mays EL. 1980. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (3): 505-510.
- Bergstermann A, Cárdenas L, Bol R, Gilliam L, Goulding K, et al. 2011. Effect of antecedent soil moisture conditions on emissions and isotopologue distribution of N₂O during denitrification. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (2): 240-250.
- Boyle-Yarwood S, Bottomley PJ, Myrold DD. 2008. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental Microbiology* 10 (11): 2956-2965.
- Briones AM, Okabe S, Umemiya Y, Ramsing NB, Reichardt W, Okuyama H. 2002. Influence of different cultivars on population of ammonia-oxidizing bacteria in the root environment of rice. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6):3067-3075.
- Bronson KF, Neue HU, Abao E, Singh U. 1997. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil: II. Fallow period emissions. *Soil Science Society of America Journal* 61 (3): 988-993.
- Chen X, Zhang LM, Shen JP, Wei WX, He JZ. 2011. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy. *Soil Biology and Fertility Soils* 47 (3): 323-331.
- Chen X, Zhang LM, Shen JP, Xu Z, He JZ. 2010. Soil type determines the abundance and community structure of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in flooded paddy soils. *Journal of Soils and Sediments* 10 (8):

1510-1516.

- Chen XP, Zhu YG, Xia Y, Shen JP, He JZ. 2008. Ammonia-oxidizing archaea: Important players in paddy rhizosphere soil? *Environmental Microbiology* 10 (8): 1978-1987.
- Conrad R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews* 60 (4): 609-640.
- Crutzen PJ. 1981. Atmospheric chemical processes of the oxide nitrogen, including nitrous oxide. En: Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. C.C. Delwiche (Ed.). New York: John Wiley and Sons. 17-44.
- Cuhel J, Simek M, Laughlin RJ, Bru D, Cheneby D, Watson C, Philippot L. 2010. Insights into the effect of soil pH on N₂O and N₂ emissions and denitrifier community size and activity. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (6): 1870-1978.
- Dai Y, Di HJ, Cameron KC, He JZ. 2013. Effects of nitrogen application rate and a nitrification inhibitor dicyandiamide on ammonia oxidizers and N₂O emissions in a grazed pasture soil. *Science of the Total Environment* 465: 125-135.
- Das S, Adhya TK. 2014. Effect of combine application of organic manure and inorganic fertilizer on methane and nitrous oxide emissions from a tropical flooded soil planted to rice. *Geoderma* 213: 185-192.
- Davidson EA, David MV, 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 NH. 2012. Excess nitrogen in the U.S. environment: Trends, risks, and solutions. *Issues in Ecology* 15: 1-16.
- De Datta SK, Buresh RJ. 1989. Integrated nitrogen management in irrigated rice. En: *Advances in soil science*. New York: Springer. 143-169.
- Di HJ, Cameron KC, Sherlock RR, Shen JP, He JZ., Winefield CS. 2010. Nitrous oxide emissions from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor,

- dicyandiamide, and relationships with ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Journal of Soils and Sediments* 10 (5): 943-954.
- Di HJ, Cameron KC, Shen JP, Winefield CS, O'Callaghan M, Bowatte S, He JZ. 2009. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience* 2 (9): 621-624.
- Di Rienzo JA., Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobermann A, Witt C. 2000. The potential impact of crop intensification on carbon and nitrogen cycling in intensive rice systems. En: Carbon and nitrogen dynamics in flooded soils. Kirk G JD, Olk D C. (Eds). Los Baños: IRRI, 1-25.
- Domínguez V, Irisarri P, Gonnet S. 2007. Emisiones de óxido nitroso por suelos cultivados con arroz: efecto de un inhibidor de la nitrificación. *Agrociencia Uruguay* 11 (2): 50-57.
- Enwall K, Throback IN, Stenberg M, Söderström M, Hallin S. 2010. Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (7): 2243-2250.
- Francis C, Roberts KJ, Beman, JM, Santoro AE, Oakley BB. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41): 14683-14688.
- Galbally IE, Freney JR, Muirhead WA, Simpson JR, Trevitt ACF, Chalk PM. 1987. Emission of nitrogen oxides (NO_x) from a flooded soil fertilized with urea: Relation to other nitrogen loss processes. *Journal of Atmospheric Chemistry* 5 (3): 343-365.
- Ghoneim A, Al-modaihsh A, Naeem S, Metwally T, Gewailly E. 2014. Examination of nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*) in soil around its

- roots. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences 4 (3): 30-38.
- Ghosh P, Kashyap AK. 2003. Effect of rice cultivars on rate of N-mineralization, nitrification and nitrifier population size in an irrigated rice ecosystem. Applied Soil Ecology 24 (1): 27-41.
- Giles J. 2005. Fallout of fertilizers set too low, studies warm. Nature 434 (7031): 262-266.
- Glaser K, Hackl E, Inselsbacher E, Strauss J, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A. 2010. Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. FEMS Microbiology and Ecology 74(3): 575-591.
- Gopalakrishnan S, Watanabe T, Pearse SJ, Ito O, Hossain Z, Subbarao GV. 2009. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria humidicola* roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. Soil Science and Plant Nutrition 55 (5): 725-733.
- Graf DRH, Jones CM, Hallin S. 2014. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. PLoS ONE 9(12): 1-20.
- Granli T, Bøckman OC. 1994. Nitrous oxide from agriculture. Norwegian Journal of Agricultural Science 12: 7-128.
- Groffman PM. 2012. Terrestrial denitrification: challenges and opportunities. Ecological Processes 1 (1): 1-11.
- Groffman PM, Butterbach-Bahl K, Fulweiler RW, Gold AJ, Morse JL, Stander EK, Tague C, Tonitto C, Vidon P. 2009. Challenges to incorporating spatially and temporally explicit phenomena (hotspots and hot moments) in denitrification models. Biogeochemistry 93: 49-77.
- Gubry-Rangin C, Nicol G W, Prosser J I. 2010. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. FEMS Microbiology Ecology 74

(3): 566-574.

- Guo Y J, Di H.J, Cameron K C, Li B. 2014. Effect of application rate of a nitrification inhibitor, dicyandiamide (DCD), on nitrification rate, and ammonia-oxidizing bacteria and archaea growth in a grazed pasture soil: An incubation study. *Journal of Soils and Sediments* 14 (5): 897-903.
- Guynot ME, Toribio A, Quevedo M, Muxí L. 1998. Microflora of dissimilative nitrate reduction in a denitrifying reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (3): 396-400.
- Hai B, Diallo NH, Sall S, Haesler F, Schauss K., Bonzi M, Schloter M. 2009. Quantification of key genes steering the microbial nitrogen cycle in the rhizosphere of sorghum cultivars in tropical agroecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (15): 4993-5000.
- Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2011. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology* 77 (1), 154-164.
- Hayatsu M, Tago K, Saito M. 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54 (1): 33-45.
- Henry S, Texier S, Hallet S, Bru D, Dambreville C, Chèneby D, Bizouard F, Germon JC, Phillippot L. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: Insight into the role of root exudates. *Environmental Microbiology* 10 (11): 3082-3092.
- Hernández J, Berger A. 2003. Investigaciones Agronómicas. Reporte Técnico Anual – Área Cultivos – Programa Nacional de Arroz. INIA Treinta y Tres, Uruguay. 34-40.
- Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N, De Vos P. 2006. Cultivation of denitrifying bacteria: Optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4): 2637-2643.

- Hink L, Nicol GW, Prosser JI. 2016. Archaea produce lower yields of N₂O than bacteria during aerobic ammonia oxidation in soil. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.13282
- Hou AX, Chen GX, Wang ZP, Van Cleemput O, Patrick WH Jr. 2000. Methane and nitrous oxide emissions from rice field in relation to soil redox and microbiological processes. *Soil Science Society of America Journal* 64 (6): 2180-186.
- Hussain S, Peng S, Fahad S, Khaliq A, Huang J, Cui K, Nie L. 2014. Rice management interventions to mitigate greenhouse gas emissions: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (5): 3342-3360.
- Iizumi T, Mizumoto M, Nakamura K. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 3656-3662.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. Summary for Policymakers. En: *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Edenhofer, O. y col (Eds.). Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. 2007. *Climate change 2007: the physical science basis*. Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press. 137-153.
- IPCC. 2006. *IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme. Eggleston H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T., Tanabe K.(Eds). Cambridge, United Kingdom and New York, USA: Cambridge University Press.
- Ipinmoroti RR, Watanabe T, Ito O. 2008. Effect of *Brachiaria humidicola* root exudates, rhizosphere soils, moisture and temperature regimes on nitrification inhibition in two volcanic ash soils of Japan. *World Journal of Agricultural Science* 4 (1): 106-113.

- Irisarri P, Pereyra V, Fernández A, Terra J, Tarlera S. 2012. Emisiones de CH₄ y N₂O en un arrozal: primeras medidas en el sistema productivo uruguayo. *Agrociencia Uruguay* 16 (2): 1-10.
- Irisarri P, Perdomo C. 2009. Principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario en Uruguay. En: Emisiones de metano y óxido nitroso: Irisarri P. (Ed.). Montevideo, Universidad de la República. 1-29.
- Irisarri P, Gonnet S, Deambrosi E, Monza J. 2007. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (2), 237-242.
- Ishii S, Yamamoto M, Kikuchi M, Oshima K, Hattori M, Otsuka S, Senoo K. 2009. Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S rRNA gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (22): 7070-7078.
- Ishikawa T, Subbarao GV, Ito O, Okada K. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. 2003. *Plant and Soil* 255:413-419.
- Jones CM, Spor A, Brennan FP, Breuil MC, Bru D, Lemanceau P, Griffiths B, Hallin S, Philippot L. 2014. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity (Supplementary Information). *Nature Climate Change*, 4 (9): 801-805.
- Jones CM. 2010. Denitrification: From Genes to Ecosystems. *Sciences-New York*. vol. 2010, N° 83.
- Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S. 2008. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution* 25 (9): 1955-1966.
- Kader MA, Sleutel S, Begum SA, Moslehuddin AZM. 2013. Nitrogen mineralization in sub-tropical paddy soils in relation to soil mineralogy, management, pH, carbon, nitrogen and iron contents. *European Journal of Soil Science* 64

(1): 47-57.

- Kandeler E. 1996a. N-Mineralization Under Waterlogged Conditions. En: *Methods in Soil Biology*. Capítulo 9. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.). Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 141-143.
- Kandeler E. 1996b. Potential nitrification. En: *Methods in Soil Biology*. Capítulo 10. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds.) Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 146-149.
- Kleineidam K, Košmrlj K, Kublik S, Palmer I, Pfab H, Ruser R, Fiedler S, Schloter M. 2011. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizosphere and bulk soil. *Chemosphere* 84 (1): 182-186.
- Kögel-Knabner I, Amelung W, Cao Z, Fiedler S, Frenzel P, Jahn R, Kalbitz K, Kölbl A, Schloter M. 2010. Biogeochemistry of Paddy Soils. *Geoderma* 157 (1): 1-14.
- Kowalchuk GA, Stephen JR. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55 (1): 485-529.
- Kravchenko IK y Yu K. 2006. Relationship between major soil properties and culturable microorganisms affecting CH₄ and N₂O dynamics in rice soils. *Archives of Agronomy & Soil Science* 52 (6): 607-615.
- Lan T, Han Y, Cai Z. 2015. Denitrification and its product composition in typical Chinese paddy soils. *Biology and Fertility of Soils* 51 (1): 89-98.
- Le Mer J, Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37 (1): 25-50.
- 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 (7104): 806-809.

- 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 (2): 195-203.
- Liu C, Wang K, Zheng X. 2013. Effects of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat-maize cropping system. *Biogeosciences Discussions* 10 (4), 2427-2437.
- Liu S, Qin Y, Zou J, Liu Q. 2010. Effects of water regime during rice-growing season on annual direct N₂O emission in a paddy rice-winter wheat rotation system in southeast China. *Science of the Total Environment* 408 (4): 906-913.
- Liu Y, Yang Y, Qin H ling, Zhu Y jun, Wei WX. 2014. Differential responses of nitrifier and denitrifier to dicyandiamide in short- and long-term intensive vegetable cultivation soils. *Journal of Integrative Agriculture* 13 (5): 1090-1098.
- Majumdar D. 2013. Biogeochemistry of N₂O uptake and consumption in submerged soils and rice fields and implications in climate change. *Critical Review Environment Science Technology* 43 (24): 2653-2684.
- McGeough KL, Watson CJ, Müller C, Laughlin RJ, Chadwick DR. 2016. Evidence that the efficacy of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) is affected by soil properties in UK soils. *Soil Biology and Biochemistry* 94 (3): 222-232.
- Morley NJ, Richardson DJ, Baggs EM. 2014. Substrate induced denitrification over or underestimates shifts in soil N₂/N₂O ratios. *Plos One* 9 | e108144.
- Mosier AR. 1998. Soil processes and global change. *Biology and Fertility of Soils* 27 (3): 221-229.
- Mounier E, Hallet S, Chèneby D, Benizri E, Gruet Y, Nguyen C, Piutti S, Robin C, Slezack-Deschaumes S, Martin-Laurent F, Germon JC, Philippot L. 2004. Influence of maize mucilage on the diversity and activity of the denitrifying community. *Environmental Microbiology* 6 (3): 301-312.

- Mulvaney RL, Khan SA, Mulvaney CS. 1997. Nitrogen fertilizers promote denitrification. *Biology and Fertility of Soils* 24 (2): 211-220.
- Mulvaney RL. 1996. Extraction of Exchangeable Ammonium and Nitrate and Nitrite, En: *Soil Science Society of America Book Series: 5. Methods of Soil Analysis, Parte 3-Chemical Methods*. SSSA, Madison, Wisconsin. 1129-1131.
- Nardi P, Akutsu M, Tanaka-Tanaka J, Wissuwa M. 2013. Effect of methyl 3-4-hydroxyphenyl propionate, a Sorghum root exudate, on N dynamic, potential nitrification activity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Plant and Soil* 367(1-2): 627-637.
- Nicolaisen MH, Risgaard-Petersen N, Revsbech NP, Reichardt W, Ramsing NB. 2004. Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field. *FEMS Microbiology Ecology* 49 (3): 359-369.
- Norton JM, Stark JM. 2011. Regulation and measurement of nitrification in terrestrial systems. *Methods in Enzymology*, 486, 343-368.
- Nuñez, J. 2015. Potencial de la inhibición biológica de la nitrificación (IBN) en forrajes tropicales. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia.
- O'Callaghan M, Gerard EM, Carter PE, Lardner R, Sarathchandra U, Burch G, Ghani A, Bell N. 2010. Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil Biology and Biochemistry* 42 (9): 1425-1436.
- Opel KL, Chung D, McCord BR. 2009. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences*. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Paterson E, 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. *European Journal of Soil Science* 54 (4): 741-750.

- 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 (2): 119-128.
- Pereyra V. 2009. Emisiones de metano y óxido nitroso en arrozales de la zona este del Uruguay: el manejo de cultivo como factor determinante. Pasantía de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Profundización en Biotecnología. Facultad de Química-Facultad de Ciencias. UDELAR. 40 p.
- Philippot L, Hallin S. 2011. Towards food, feed and energy crops mitigating climate change. *Trends in Plant Science* 16 (9): 476-480.
- Pittelkow CM, Zorrilla G, Terra J, Riccetto S, Macedo I, Bonilla C, Roel A. 2016. Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Global Food Security*, 9: 10-18.
- Ravishankara AR, Daniel JS, Portmann RW. 2009. Nitrous oxide (N₂O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century. *Science* 326 (5949): 123-125.
- Rhine ED, Mulvaney RL, Pratt EJ, Sims GK. 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Science Society of America Journal* 62 (2): 473-480.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W, 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4704-4712.
- Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM, Trevors JT. 2005. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*, 63 1-19.
- Sanford RA, Wagner DD, Wu QZ, Chee-Sanford JC, Thomas SH, Cruz-Garcia C, Rodríguez G, Massol-Deyá A, Krishnani KK, Ritalahati KM, Nissen S, Konstantinidis K, Löffler FE. 2012. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 109 (48): 19709-19714.

Schmidt AL, Werner RA, Yoshida N, Well R. 2004. Is the isotopic composition of nitrous oxide indicator for its origin from nitrification or denitrification? A theoretical approach from referred data and microbiological and enzyme kinetic aspects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18 (18): 2036-2040.

Schmidt EL, Belser LW. 1994. Autotrophic Nitrifying Bacteria. En: *Soil Science Society of America Book Series: 5. Methods of Soil Analysis, parte 2 – Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA, Madison, Wisconsin. 159-177.

Schreiber F, Wunderlin P, Undert KM, Wells G.F. 2012. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies. *Frontiers in Microbiology* 3, 372.

Shepherd M, Wyatt J, Welten B. 2012. Effect of soil type and rainfall on dicyandiamide concentrations in drainage from lysimeters. *Soil Research* 50 (1): 67-75.

Sher Y, Zaady E, Nejidat A. 2013. Spatial and temporal diversity and abundance of ammonia oxidizers in semi-arid and arid soils: indications for a differential seasonal effect on archaeal and bacterial ammonia oxidizers. *FEMS Microbiology Ecology* 86 (3): 544-556.

Shi S, Richardson AE, O'Callaghan M, DeAngelis KM, Jones EE, Stewart A, Firestone MK, Condon LM. 2011. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 77 (3): 600-610.

Smith K, 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(4):

779-791.

- Smith Z, McCaig AE, Stephen JR, Embley TM, Prosser JI. 2001. Species diversity of uncultured and cultured populations of soil and marine ammonia oxidizing bacteria. *Microbial Ecology* 42 (3): 228-237.
- Stevens R J, Laughlin R J, Burns L C, Arah J R M, Hood R C. 1997. Measuring the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 29(2): 139-151.
- Subbarao GV, Yoshihashi T, Worthington M, Nakahara K, Ando Y, Sahrawat KL, Rao IM, Lata JC, Kishii M, Braun HJ. 2015. Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science* 233: 155-164.
- Subbarao GV., Sahrawat KL, Nakahara K, Rao IM, Ishitani M, Hash CT, Kishii M, Bonnett DG, Berry WL, Lata JC. 2013a. A paradigm shift towards low-nitrifying production systems: The role of biological nitrification inhibition (BNI). *Annals of Botany* 112 (2): 297-316.
- Subbarao GV, Nakahara K, Ishikawa T, Ono H, Yoshida M, Yoshihashi T, Zhu Y, Zakir HAKM, Deshpande SP, Hash CT, Sahrawat KL. 2013b. Biological nitrification inhibition (BNI) activity in sorghum and its characterization. *Plant and Soil* 366(1-2): 243-259.
- Subbarao GV, Sahrawat KL, Nakahara K, Ishikawa T, Kishii M, Rao IM, Hash CT, George TS, Srinivasa Rao P, Nardi P, Bonnett D, Berry W, Suenaga K, Lata JC. 2012. Biological nitrification inhibition-a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in Agronomy*, 114 (1): 249-302.
- 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 of the United States of America* 106 (41): 17302-17307.

- Subbarao GV, Rondon M, Ito O, Ishikawa T, Rao I M, Nakahara K, Lascano CE, Berry WL 2007a. Biological nitrification inhibition (BNI) - Is it a widespread phenomenon? *Plant and Soil* 294(1-2): 5-18.
- Subbarao GV, Wang HY, Ito O, Nakahara K, Berry WL. 2007b. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant and Soil* 290 (1-2): 245-257.
- Subbarao GV, Tomohiro B, Masahiro K, Osamu I, Samejima H, Wang HY, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Nakahara K, Zakir HAKM, Tsujimoto H, Berry WL. 2007c. Can biological nitrification inhibition (BNI) genes from perennial *Leymus racemosus* (Triticeae) combat nitrification in wheat farming? *Plant and Soil* 299 (1-2): 55-64.
- Subbarao GV, Ito O, Sahrawat KL, Berry WL, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rondon M, Rao I M. 2006a. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—Challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (4): 303-335.
- Subbarao GV, Ishikawa T, Ito O, Nakahara K, Wang HY, Berry WL. 2006b. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: A case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant and Soil* 288 (1-2): 101-112.
- Sun L, Lu Y, Yu F, Kronzucker HJ, Shi W. 2016. Biological nitrification inhibition by rice root exudates and its relationship with nitrogen-use efficiency. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.14057
- Tanaka PJ, Nardi P, Wissuwa M. 2010. Nitrification inhibition activity, a novel trait in root exudates of rice. *AoB Plants* 10 (3): 1-11.
- Tarlera S, Capurro MC, Irisarri P, Scavino AF, Cantou G, Roel A. 2016. Yield-scaled global warming potential of two irrigation management systems in a highly productive rice system. *Scientia Agricola* 73 (1): 43-50.
- Tarlera S, Pereyra V, Fernández A. 2009. Emisiones de metano y óxido nitroso en la rotación arroz-pastura. En: Irisarri P (Ed.). Emisiones de metano y óxido

nitroso: principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario en Uruguay. Montevideo: Universidad de la República. 69-79.

Tesfamariam T, Yoshinaga H, Deshpande SP, Srinivasa Rao P, Sahrawat KL, Ando Y, Nakahara K, Hash CT, Subbarao GV. 2014. Biological nitrification inhibition in sorghum: The role of sorgoleone production. *Plant and Soil* 379 (1-2): 325-335.

Tiedje J M. 1994. Denitrifiers. En: *Soil Science Society of America Book Series: 5. Methods of Soil Analysis, parte 2 – Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA, Madison, Wisconsin. 245-267.

Towprayoon S, Smakgahn K, Poonkaew S. 2005. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from drained irrigated rice fields. *Chemosphere* 59 (11): 1547-1556.

van Groenigen JW, Huygens D, Boeckx P, Kuiper TW, Lubbers IM, Rütting T, Groffman PM. 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil* 1 (1): 235-256.

Verhamme DT, Prosser JI, Nicol GW. 2011. Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *The ISME Journal* 5 (6): 1067-1071.

Vityakon P, Dangthaisong N. 2005. Environmental influences on nitrogen transformation of different quality tree litter under submerged and aerobic conditions. *Agroforestry Systems* 63 (3): 225-236.

von Arnold K, Nilsson M, Hånell B, Weslien P, Klemetsson L. 2005. Fluxes of CO₂, CH₄ and N₂O from drained organic soils in deciduous forests. *Soil Biology and Biochemistry* 37 (6): 1059-1071.

Wallenstein MD, Myrold DD, Firestone M, Voytek M. 2006. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecology Applications* 16 (6): 2143-52.

- Wang J, Dong H, Wang W, Gu JD. 2014. Reverse-transcriptional gene expression of anammox and ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soybean and rice paddy soils of Northeast China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (6): 2675-86.
- Wang S, Wang Y, Feng X, Zhai L, Zhu G. 2011. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (2): 779-787.
- Watanabe T, Chairoj 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* 57 (1): 55-65.
- Webster FA, Hopkins DW. 1996. Contributions from different microbial processes to N₂O emission from soil under different moisture regimes. *Biology and Fertility of Soils* 22 (4): 331-335.
- Wertz S, Leigh AK, Grayston SJ. 2012. Effects of long-term fertilization of forest soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiology Ecology* 79 (1): 142-154.
- Wu Y, Ke X, Hernández M, Wang B, Dumont MG, Jia Z, Conrad R. 2013. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (9): 3076-3084.
- Xing G, Zhao X, Xiong Z, Yan X, Xu H, Xie Y, Shi S. 2009. Nitrous oxide emission from paddy fields in China. *Acta Ecologica Sinica* 29 (1): 45-50.
- Xing GX, Shi SL, Shen GY, Du LJ, Xiong ZQ. 2002. Nitrous oxide emissions from paddy soil in three rice-based cropping systems in China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 64 (1): 135-143.
- Yang Y, Zhang J, Cai Z. 2016. Nitrification activities and N mineralization in paddy soils are insensitive to oxygen concentration. *Acta Agricultural Science and B*

Soil Plant Science 66 (3): 272-281.

- Yeasmin S, Islam AKM M, Islam AA. 2012. Nitrogen fractionation and its mineralization in paddy soils: a review. *Journal of Agricultural Science Technology* 8 (3): 775-793.
- Yin C, Fan F, Song A, Li Z, Yu W, Liang Y. 2014. Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS* - and *nirK* -denitrifying bacterial community. *European Journal of Soil Biology* 65: 47-56.
- Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, Senoo K. 2009. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (10): 2044-2051.
- Yu K, Patrick WH. 2004. Redox window with minimum global warming potential contribution from rice soils. *Soil Science Society of America Journal* 68 (6): 2086-2091.
- Zakir HA, Subbarao GV, Pearse SJ, Gopalakrishnan S, Ito O, Ishikawa T, Kawano N, Nakahara K, Yoshihashi T, Ono H, Yoshida M. 2008. Detection, isolation and characterization of a root-exuded responsible for biological nitrification inhibition by sorghum (*Sorghum bicolor*). *New Phytologist* 180 (2): 442-451.
- Zerulla W, Barth T, Dresse, J, Erhardt K, Horchler von Locquenghien K, Pasda G, Radle M, Wissemeier A H. 2001. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) – a new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. *Biology and Fertility of Soils* 34: 79-84.
- Zhang LM, Hu HW, Shen JP, He JZ. 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *The ISME Journal* 6 (5): 1032-45.
- Zhu X, Burger M, Doane T a, Horwath WR. 2013. Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N₂O and NO under low oxygen availability. *Proceedings of the National Academy of Science* 110

(16): 6328-6333.

Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61 (4): 533-616.

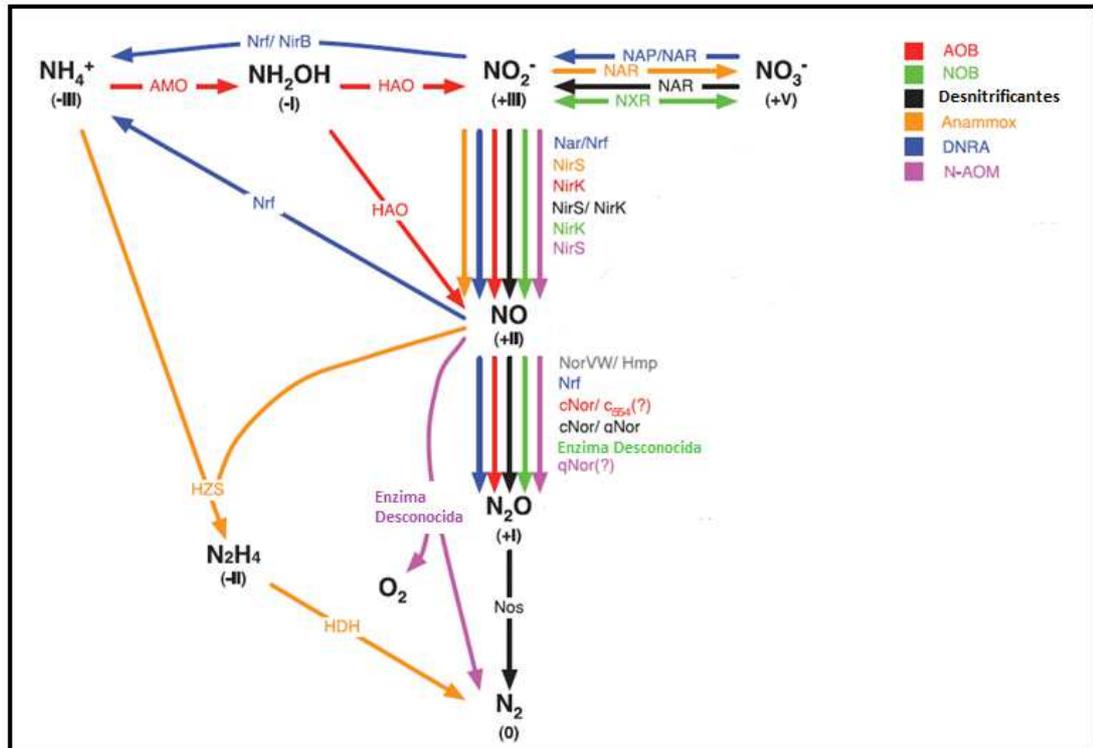
6. ANEXOS

ANEXO 1

ABREVIATURAS

AMO	Amonio monooxigenasa
ANAVA	Análisis de varianza
AOA	Arqueas oxidantes del amonio
AOB	Bacterias oxidantes del amonio
ATU	Unidades de aliltiurea
BNI	Inhibición biológica de la nitrificación
Ce	Conductividad eléctrica
cv.	Cultivar
DCD	Diciandiamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
GEI	Gas de efecto invernadero
HAO	Hidroxilamina oxidoreductasa
metOH	Metanol
MO	Materia orgánica
NMP	Número más probable
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RLU	Unidades de luz relativas
ss	Suelo seco

ANEXO 2



Esquema de los pasos biológicos de emisión de N_2O . Cada color corresponde a un grupo microbiano: (rojo) AOB, bacterias oxidantes del amonio, (verde) NOB, bacterias oxidantes del nitrito, (negro) Desnitrificantes, reductores del nitrato/nitrito, (anaranjado) Anammox, oxidación anaeróbica del amonio, (azul) DNRA, reducción desasimilativa del nitrito/nitrato a amonio, (violeta) N-AOM, oxidación anaeróbica de metano dependiente de nitrito. Para cada grupo se presentan las vías de transformación de compuestos químicos de nitrógeno y las enzimas responsables: AMO, amonio monooxigenasa; HAO, hidroxilamina oxidoreductasa, NXR, nitrito oxidoreductasa; Nar, nitrato reductasa de membrana; Nap, nitrato reductasa periplásmica; NirK, nitrito reductasa dependiente de Cu; NirS, nitrito reductasa citocromo cd_1 ; Nrf, nitrito reductasa citocromo c; NirB, nitrito reductasa citoplásmica; cNor, oxido nítrico reductasa que acepta e^- del citocromo c; qNor, oxido nítrico reductasa que acepta electrones de quinoles; c554, citocromo c_{554} ; NorVW, flavorubridoxina, Hmp, flavohemoglobina; HZS, hidracina sintasa; HDH, hidracina dehidrogenasa; Nos, oxido nitroso reductasa; NOS, oxido nítrico sintasa; enzimas desconocidas. Los números romanos indican el estado de oxidación de los compuestos químicos (modificado de Schreiber et al. 2012).

ANEXO 3

Emisión de N₂O y microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno en dos arrozales de Uruguay

Nitrous oxide emission and microorganisms involved in the nitrogen cycle in two Uruguayan ricefields

Gabriela Illarze*^(a), Sara Riccetto ^(b), Pilar Irisarri^(a)

^(a)Laboratorio de Microbiología, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 809, 12900 Montevideo, Uruguay.

^(b)INIA Treinta y Tres, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ruta 8, Km 281, Treinta y tres, Uruguay

* gillarze@fagro.edu.uy

Resumen

Los procesos microbianos como mineralización, nitrificación y desnitrificación regulan la dinámica del nitrógeno en el suelo. Estos dos últimos son los principales responsables de la emisión de N₂O. En este trabajo se determinaron los flujos de N₂O en momentos claves del ciclo de cultivo del arroz, siembra, macollaje, primordio floral y madurez, en dos sitios que diferían principalmente en el contenido de materia orgánica del suelo (MO), Salto (mayor MO) y Treinta y Tres. También se determinó el potencial de mineralización neta de N y las actividades y número más probable (NMP) de oxidantes de NH₄⁺ y desnitrificantes. El potencial de mineralización de N, así como la actividad y NMP de oxidantes de NH₄ no variaron con el tipo de suelo. Sin embargo, la actividad y NMP de desnitrificantes fueron mayor en el suelo con mayor contenido de MO, independiente de la etapa del cultivo de arroz. A su vez, en las etapas finales del cultivo el NMP de desnitrificantes aumentó coincidiendo con el mayor potencial de mineralización y contenido de N mineral del suelo. Solo se observó un mayor flujo de N₂O en el suelo de Salto a la madurez del arroz y cuando el suelo había sido drenado (44,2 vs 20,8 g N-N₂O ha⁻¹ d⁻¹ en Treinta y Tres). La emisión de N₂O correlacionó con el NMP de desnitrificantes. Las correlaciones entre los parámetros microbianos y la emisión de N₂O podrían ser útiles para la modelación de los flujos de este gas.

Abstract

Microbial processes like mineralization, nitrification and denitrification regulate nitrogen dynamics in the soil. The last two may produce N₂O. In this work the N₂O fluxes were quantified at four moments of the rice cycle, sowing, tillering, panicle initiation and maturity, in two sites that differed mainly in their soil organic matter (OM) content, Salto (higher OM) and Treinta y Tres. Potential net N mineralization, ammonium oxidation and denitrification as well as most probable number (MPN) of ammonium oxidizers and denitrifiers were determined. The potential N mineralization did not vary with the soil type and increased at rice maturity. Ammonium oxidation potential and MPN were neither different among soils. However, the soil with higher OM presented higher activity and MPN of denitrifiers

irrespective of the rice stage. In turn, at the latest phases of the crop, the MPN of denitrifiers increased coinciding with the highest mineralization potential and mineral N content of the soil. Significant differences in N₂O flux were observed in Salto, where the highest emissions were detected at rice maturity, after the soil was drained (44,2 vs 20,8 g N-N₂O ha⁻¹ d⁻¹ in Treinta y Tres). N₂O emission correlated with MPN of denitrifiers. Correlations between microbiological parameters and N₂O emission may be useful for modelling this gas fluxes.

Palabras clave: óxido nitroso, desnitrificación, oxidación de amonio, actividad microbiana potencial, arrozal

Keywords: nitrous oxide, denitrification, ammonia oxidation, potential microbial activity, rice field

INTRODUCCIÓN

Los procesos microbianos como la mineralización, nitrificación y desnitrificación regulan la dinámica del nitrógeno (N) en el suelo. La nitrificación a través de la oxidación de amonio (NH₄⁺) produce nitrato (NO₃⁻), una forma móvil de N, que es la principal vía de pérdida de N por lixiviación y Desnitrificación³⁸.

La oxidación de NH₄⁺ y la desnitrificación en el suelo generan emisiones de óxido nitroso (N₂O), un potente gas de efecto invernadero (GEI). La oxidación de NH₄⁺ es un proceso aerobio pero cuando la provisión de oxígeno (O₂) es limitada se genera N₂O como subproducto, mientras que la desnitrificación se activa una vez que el O₂ ha sido consumido generando microambientes anóxicos dentro del perfil del suelo³⁶. El cultivo de arroz irrigado, que ocupa aproximadamente 175.000 ha en Uruguay¹, es considerado una fuente importante de metano (CH₄) fundamentalmente y de

N_2O ¹⁹. Los arrozales proveen un ambiente único para la producción de N_2O , debido a variaciones frecuentes en las características de los suelos, como el pH, compuestos orgánicos lábiles, contenido de humedad, disponibilidad de nutrientes y la actividad microbiana durante todo el ciclo del cultivo⁵⁰. Asimismo, la existencia de interfaces óxicas-anóxicas en los suelos cultivados con arroz favorece el acoplamiento entre los procesos de nitrificación y desnitrificación.

Dos de las principales áreas del cultivo de arroz en Uruguay se distribuyen en la zona este y norte¹. Los suelos de estas zonas poseen distintas propiedades fisicoquímicas y capacidad de anegamiento¹⁶ que podrían influir en la dinámica de las poblaciones y la actividad potencial de nitrificantes y desnitrificantes, así como en las formas minerales del N presentes en el suelo. Trabajos sobre las emisiones de GEI en un arrozal del este uruguayo comprobaron que la máxima emisión de N_2O se produce luego de la aplicación de urea e inundación del cultivo al inicio del macollaje y no se observaron emisiones de N_2O luego de dos semanas de inundado el cultivo^{18 and 39}. No se cuenta con trabajos previos de evaluaciones de las emisiones de N_2O en la zona norte, ni un estudio sistemático de las actividades de mineralización, nitrificación y desnitrificación en estos suelos.

El objetivo de este trabajo fue comparar la emisión de N_2O , actividad nitrificante y desnitrificante, así como el número de microorganismos responsables de dichos procesos, en momentos claves del ciclo del cultivo de arroz sembrado en suelos con diferente contenido de materia orgánica (MO). La hipótesis planteada fue que el tipo de suelo modificaría la emisión de N_2O al afectar a las poblaciones microbianas involucradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de experimentación y manejo del cultivo

Los experimentos se realizaron en dos arrozales durante la zafra de arroz 2013-14, en los departamentos de Treinta y Tres (zona este de Uruguay) y de Salto (zona norte), en la Unidad Experimental Paso de la Laguna del INIA Treinta y Tres (33°15' S, 54°10' O), perteneciente a la unidad de suelo La Charqueada⁴ y en un predio comercial perteneciente a la Unidad de suelo Itapebí-Tres Árboles (31°22'S, 57°27'O). Las propiedades físicoquímicas de los suelos se resumen en la tabla 1.

El cultivo de arroz (cv. El Paso L144) se instaló con siembra directa a una densidad de 150 kg ha⁻¹. Se inundó a macollaje y se realizó una fertilización nitrogenada fraccionada, a la siembra se agregó fosfato de amonio (18-46) 25 kg N ha⁻¹ y las otras 2 fertilizaciones fueron con urea (23 kg N ha⁻¹).

La temperatura promedio durante el ciclo del cultivo fue 21,3 °C y 23,4 °C para Treinta y Tres y Salto, respectivamente. La precipitación acumulada durante el ciclo del cultivo para Treinta y Tres fue 762 mm, de los cuales se registraron 222 mm previo a la inundación. En Salto la precipitación fue 882 mm y previo a la inundación se registraron 376 mm.

Muestreo de suelos

Se seleccionaron cuatro parcelas completamente al azar y se tomaron seis submuestras de suelo a 15 cm de profundidad para realizar una muestra compuesta. Los muestreos se realizaron a la siembra, macollaje, primordio floral y a la madurez del cultivo. Los tres primeros estadios correspondieron al día siguiente a la fecha de las fertilizaciones nitrogenadas (solo al estadio de primordio la fertilización se realizó

en agua) y el último fue previo a la cosecha y posterior al drenado del suelo. Las muestras de suelo se mantuvieron a 5 °C para su posterior análisis. Con esas muestras se cuantificó la actividad potencial y el NMP de microorganismos desnitrificantes y oxidantes de NH_4^+ , el potencial de mineralización de N y el contenido de NH_4^+ y NO_3^- .

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los suelos de Salto y Treinta y Tres a la siembra.

	Salto (norte)	Treinta y Tres (este)
Tipo de suelo	Vertisol háplico	Brunosol subeútrico típico
Textura	Arcillo-limoso	Arcillo - limoso
pH (H ₂ O)	5,6	5,7
Materia orgánica (%)	5,8	3,4
P-Bray 1 (ppm)	10	13
K (cmol kg ⁻¹)	0,62	0,42
Mg (cmol kg ⁻¹)	9,4	3,3
Ca (cmol kg ⁻¹)	25,5	5,4
Na (cmol kg ⁻¹)	0,64	0,83

Emisión de N₂O

Los flujos de N₂O emitidos en las fechas de los muestreos de suelos se monitorearon con la técnica de cámaras cerradas estáticas descritas para arroz por Lindau et al. ²⁸. Las cámaras consistieron en bases de acero inoxidable de 40 cm de diámetro y 20 cm de altura parcialmente insertas en el suelo (5 cm), 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 ¹⁸. 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 (10 mL) 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. El análisis de N₂O se realizó con un cromatógrafo de gases Shimadzu 14B modificado con detector ECD (de captura electrónica) descrito por Perdomo et al.³². La tasa de emisión del gas se calculó según Watanabe et al.⁴⁴ y las medidas de cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron promediadas para determinar el valor final de emisión por tratamiento y fecha.

Actividades microbianas potenciales

El **potencial de mineralización de N** (PMN) se evaluó en anaerobiosis según Kandeler²³. Tubos herméticos con 15 g de suelo fresco y 15 mL de agua destilada se incubaron una semana a 40 °C. Se agregaron 15 mL de cloruro de potasio (KCl) 2M, se filtró con papel Whatmann n° 41. El contenido de NH₄⁺ se determinó colorimétricamente según el método de Berthelot³³ y se expresó como mg NH₄⁺-N d⁻¹ kg⁻¹ de suelo seco (ss).

La **actividad potencial oxidante de NH₄⁺** se determinó según Kandeler²² con algunas modificaciones. Al suelo húmedo (2,5 g) se le adicionó 7,5 mL de una solución de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ 1,33 mM, 0,05 mL de clorato de sodio 1,5 M⁸ y 2,5 mL de agua destilada estéril. La suspensión se incubó a 28 °C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Wishshake SHO-2D, Witeg Germany) por 24 horas y como controles se mantuvieron suspensiones de suelo a -20 °C. Luego de la incubación se agregó KCl 2M (15 mL), se centrifugó a 13.000 rpm y 0,5 mL del sobrenadante se resuspendió con 0,5 mL de cloruro de amonio 0,19 M. Se midió el

contenido de nitrito (NO_2^-) por la reacción colorimétrica con los reactivos de Griess-Ilosvay por espectrofotometría a 540 nm. La actividad se expresó como $\mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss}$.

La **actividad potencial desnitrificante** se realizó mediante un ensayo enzimático de inhibición con acetileno (C_2H_2)¹⁵. Se incubaron 4 g de suelo húmedo con 2 mL de glucosa 1 mM y 2 mL de nitrato de potasio (KNO_3) 1 mM en viales herméticos. En cada vial se reemplazó la atmósfera por una mezcla de N_2 y C_2H_2 para lograr condiciones anaeróbicas e inhibir la actividad N_2O reductasa. Se tomaron tres muestras de gas durante el período de incubación (2 h a 25 °C) para medir la producción de N_2O por cromatografía gaseosa. La actividad desnitrificante se expresó como $\mu\text{g N}_2\text{O h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ss}$.

Recuento de microorganismos

Se realizaron recuentos de bacterias cultivables, oxidantes de NH_4^+ y desnitrificantes por la técnica de NMP para cada muestreo de suelo. Se suspendieron 10 g de suelo fresco en 90 mL de buffer fosfato y se realizaron diluciones seriadas de 1 en 10.

Para el recuento de microorganismos oxidantes de NH_4^+ se utilizaron tubos con 4 mL de medio mineral con 5 g L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ³⁴. Se incubaron por un mes en agitación a 28 °C. Los tubos positivos (presencia de NO_2^-) se determinaron con los reactivos de Griess-Ilosvay.

En el caso de los microorganismos desnitrificantes, el recuento consistió en tubos anaeróbicos con 5 mL de medio con glucosa y KNO_3 0,25 g L^{-1} . La atmósfera se reemplazó con N_2 y C_2H_2 (10% del volumen gaseoso) y se incubaron por dos semanas en oscuridad a 28 °C. Los tubos positivos, con presencia de N_2O , se

determinaron por cromatografía gaseosa ⁴⁰. Tanto para el recuento de desnitrificantes como de oxidantes de NH_4^+ , los resultados se refirieron a tablas de probabilidad ³.

Amonio y Nitrato

Al suelo húmedo (5 g) se le agregó 15 mL de KCl 2M para su extracción, se agitó por 30 minutos y posteriormente se filtró la suspensión con papel Whatmann n° 41. El contenido de NO_3^- se cuantificó a través de la reducción a NO_2^- por una columna de cadmio y posterior determinación colorimétrica (Reacción de Griess-Ilosvay) ³¹. El contenido de NH_4^+ se cuantificó según Rhine et al. ³³. El N mineral se calculó como la suma de NH_4^+ -N y NO_3^- -N.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar el efecto del momento de muestreo y el tipo de suelo sobre las actividades potenciales, el NMP de microorganismos oxidantes de NH_4^+ y desnitrificantes y el contenido de NH_4^+ y NO_3^- . Los datos de NMP fueron transformados a logaritmo en base 10 para su análisis. También se corroboró el efecto de la interacción entre los factores suelo x momento del cultivo del arroz. Para determinar diferencias significativas entre los momentos del cultivo del arroz sobre los parámetros mencionados, se realizó un ANAVA con el test de Tukey ($p < 0,05$) y un análisis de correlación de Pearson, y se utilizó el software estadístico Infostat ¹¹. Para todas las variables se presentan las medias de 4 repeticiones \pm los errores estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mineralización neta

La mineralización del N del suelo es un proceso clave para la provisión de este nutriente a la planta de arroz ya que la mayoría es absorbido a partir de este proceso, aún en suelos fertilizados ²⁰. El PMN no presentó diferencias entre los suelos con distinto porcentaje de MO (Fig. 1a), pero sí entre momentos del cultivo de arroz. La mayor actividad potencial de mineralización se presentó a primordio floral y madurez del arroz (en promedio 4,5 g NH₄⁺-N kg⁻¹ ss d⁻¹) y se diferenció significativamente del PMN a la siembra (en promedio 1,6 g NH₄⁺-N kg⁻¹ ss d⁻¹). La mineralización del N depende de múltiples factores y la cantidad de MO del suelo no parece ser el factor principal que la afecta en este ensayo como en otros ⁴⁸. Además, a lo largo del ciclo del cultivo el contenido de raíces es mayor, varían los exudados radicales y restos celulares fácilmente degradables que podrían explicar el aumento de la mineralización hacia el final del cultivo de arroz ¹².

La medición del PMN considera la mineralización neta, en el caso del suelo inundado si bien se espera una menor mineralización bruta también la inmovilización de N por microorganismos sería menor. También se encontró mayor mineralización en suelos inundados que en condiciones aeróbicas y se atribuyó a un menor requerimiento de N por la microflora debido a una mayor proporción de bacterias respecto a hongos y actinobacterias en los suelos inundados ⁴¹. El establecimiento de la inundación por otro lado, pudo favorecer la muerte de algunos microorganismos que constituirían un pool de N fácilmente mineralizable y favorecer la reducción de

Fe^{+3} que a su vez promueve la liberación de parte de la MO del suelo protegida por minerales y libera el NH_4^+ fijado ²¹.

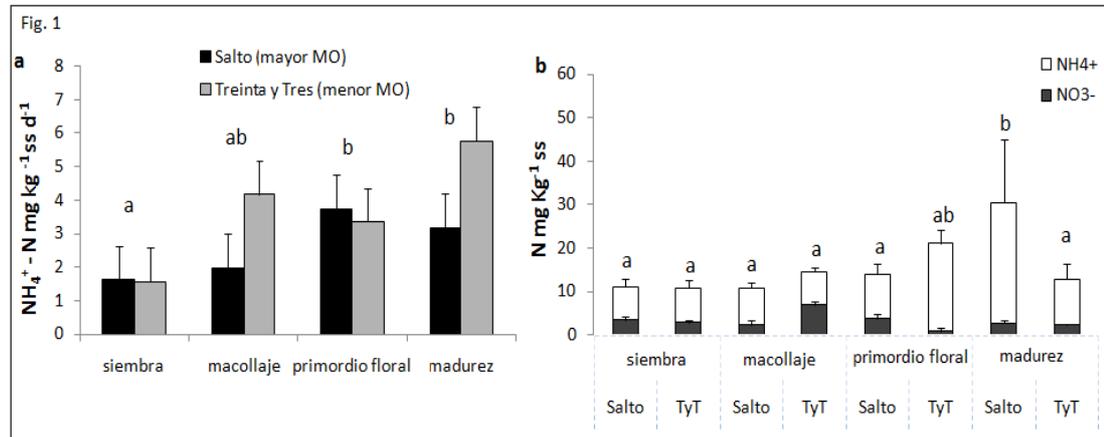


Figura 1. (a) Actividad potencial de mineralización ($\text{mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1} \text{ ss d}^{-1}$) en suelos de Salto y Treinta y Tres (TYT) y (b) Nitrógeno mineral ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^- \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$) en cuatro momentos del cultivo de arroz. Las barras representan la media + el error estándar ($n=4$). Letras diferentes indican diferencias significativas por momento del cultivo de arroz y/o tipo de suelo ($p<0,05$)

En el suelo de mayor MO el N mineral también fue significativamente mayor a la madurez del cultivo ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ ss}$) y difirió entre suelos solamente en esta etapa del cultivo (Fig. 1b). Como era de esperar, la mayor parte del N mineral se encontró bajo forma de NH_4^+ en estos suelos inundados después del macollaje (Fig. 1b). La mineralización determina el N potencialmente disponible para la planta y en caso de no ser usado por esta puede perderse del suelo por volatilización o por desnitrificación previa nitrificación.

Oxidación de amonio

La oxidación de NH_4^+ a NO_2^- es el primer paso de la nitrificación. No hubo efecto del suelo ($p=0,6$) ni del momento del cultivo del arroz ($p=0,10$) sobre la actividad potencial y el NMP de oxidantes de NH_4^+ en condiciones de campo (Fig. 2).

El NMP de oxidantes de NH_4^+ estuvo en el orden de entre 10^2 a 10^4 g^{-1} ss (Fig. 2b). Números similares fueron encontrados en arrozales tropicales y con diferentes manejos ¹⁰. Los oxidantes de NH_4^+ son microorganismos de crecimiento lento ²⁴ y solo una pequeña proporción de estos son cultivables ³⁷. La estimación de estas poblaciones con la técnica del NMP tiene estas limitaciones y se usó a efectos de ver si existía correlación con otros de los parámetros estudiados, en cuyo caso sería una metodología mucho más económica para estimar poblaciones funcionalmente activas. En un estudio con los mismos suelos de este trabajo pero con técnicas independientes del cultivo, como la amplificación por qPCR del gen de la amonio monoxigenasa, ⁶ obtuvieron valores del orden de 10^4 a 10^6 para arqueas y 10^5 a 10^7 para bacterias oxidantes de NH_4^+ . El crecimiento autotrófico de las arqueas oxidantes de NH_4^+ es discutido ⁴⁶, aunque en el suelo de Treinta y Tres por métodos independientes del cultivo se encontró que el número de bacterias oxidantes de NH_4^+ fue mayor que el de arqueas ⁶.

Hay comunicaciones que indican que la actividad potencial se relacionaría con la abundancia de bacterias oxidantes de NH_4^+ ⁴³ y otras que no ⁹. Muchos trabajos muestran que la actividad o el número de oxidantes de NH_4^+ es relativamente estable y resiliente a cambios en las condiciones ambientales ^{35 and 45}. Yang et al. ⁴⁷ sostienen que tanto la mineralización como la nitrificación en suelos inundables serían menos sensibles a la concentración de O_2 disponible. Glaser et al. ¹³ indican que un aumento en el número de oxidantes de NH_4^+ debido a su crecimiento lento solo se percibiría unos 21 días después del aumento en la concentración de NH_4^+ . En este estudio la concentración de NH_4^+ aumentó en la cosecha (Fig. 1b), por lo que un

aumento en la cantidad de oxidantes podría no detectarse en los muestreos previos realizados.

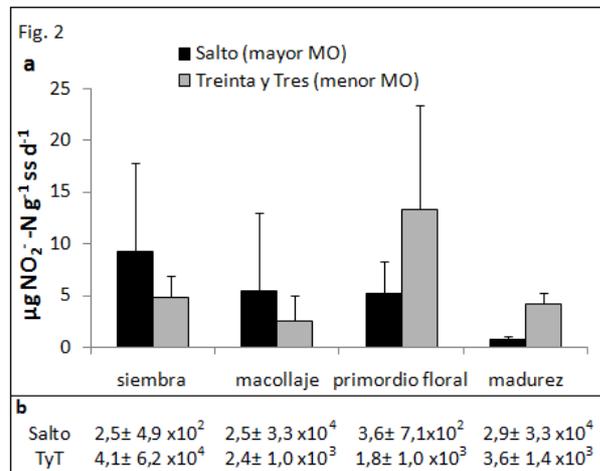


Figura 2. (a) Actividad potencial de oxidación de NH_4^+ ($\mu\text{g NO}_2\text{-N g}^{-1}\text{ ss d}^{-1}$) y (b) número más probable de oxidantes de NH_4^+ $\text{g}^{-1}\text{ ss}$ en: suelo de Salto y suelo de Treinta y Tres (TYT), en 4 momentos del cultivo de arroz. Se presentan las medias + el desvío estándar ($n=4$). Las diferencias entre suelos y fechas de muestreos no fueron significativas.

Desnitrificación

La abundancia y actividad de los microorganismos desnitrificantes ha sido ampliamente estudiada en arrozales ²⁶ donde las condiciones del cultivo favorecen este proceso. En este caso, el suelo de Salto (con mayor contenido de MO) presentó mayor actividad potencial y NMP de desnitrificantes, independientemente del momento de muestreo (Fig. 3). Las poblaciones responsables de este proceso en el suelo de Salto se ubicaron en promedio en el orden de 10^{11} y en Treinta y Tres en el orden de 10^9 . Estos microorganismos fueron significativamente superiores en ambos suelos a primordio floral y madurez del cultivo (Fig. 3). Kravchenko y Yu ²⁵ encontraron valores de NMP del orden de 10^6 para suelos arroceros de Arkansas,

donde la forma de cultivo es similar a la de Uruguay, mientras que los NMP fueron mas bajos en arrozales tropicales de India ¹⁰. La desnitrificación heterótrofa es afectada por la disponibilidad de fuentes de C, la concentración de NO_3^- , la disponibilidad de O_2 , el pH y la temperatura ¹⁴. En este estudio se usó glucosa como fuente de C tanto para el NMP como para la actividad potencial. Algunos autores como Morley et al. ³⁰ cuestionan el empleo de glucosa y sostienen que la relación $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ es menor cuando se usan ácidos dicarboxílicos, compuestos que secretan las raíces. Los desnitrificantes son microorganismos que reducen NO_3^- a compuestos gaseosos (NO , N_2O y N_2) y el NMP determinado con la técnica utilizada en este trabajo no puede distinguir entre los que realizan la reducción completa a N_2 o solo hasta N_2O .

El suelo de Salto presentó mayor potencial desnitrificante que el de Treinta y Tres (0,3 vs 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ ss, $p=0,0004$) (Fig. 3) y su mayor contenido de MO podría sustentar una alta actividad desnitrificante heterótrofa. La desnitrificación no sólo se ve favorecida con altos contenidos de MO sino también por la fertilización nitrogenada y las condiciones limitantes de O_2 ⁷. En este trabajo no hubo correlación entre NMP de desnitrificantes, el potencial de desnitrificación, ni el contenido de NO_3^- del suelo (Tabla 2); aunque dado la versatilidad metabólica de los desnitrificantes, su abundancia y actividad no siempre coinciden ⁴⁹.

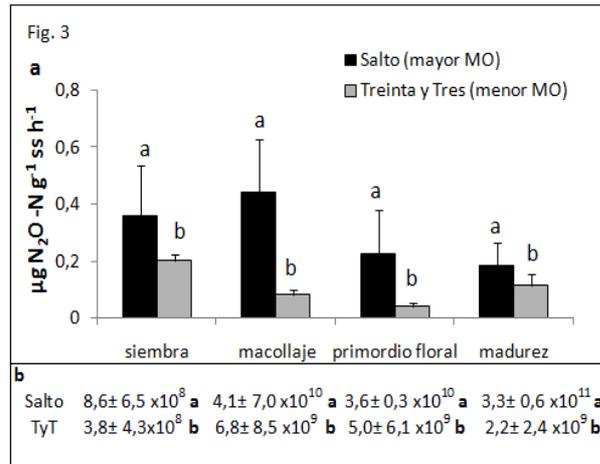


Figura 3. (a) Actividad de la enzima desnitrificante ($\mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ ss h}^{-1}$) y (b) número más probable de desnitrificantes $\text{g}^{-1} \text{ ss}$ en: suelo de Salto y suelo de Treinta y Tres, en 4 momentos del cultivo de arroz. Se presentan las medias + el desvío estándar ($n=4$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos ($p < 0,05$).

Emisión de N_2O

La emisión de N_2O se observan en la figura 4. No se constataron diferencias significativas en los flujos de N_2O para los dos sitios experimentales, salvo en el último muestreo donde el arrozal de Salto emitió mas que el de Treinta y Tres, 44,2 y -20,8 $\text{g N-N}_2\text{O ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente (Fig. 4). En la madurez del cultivo, ambos suelos se encontraban drenados, pero el de Salto presentaba mayor pendiente (1,4% comparado a 0,8% en Treinta y Tres) y probablemente un drenado mas rápido que explicaría el pico de emisión de N_2O . Este aumento en la emisión de N_2O producido luego de drenado el cultivo, también ha sido reportado por otros autores ^{2 and 18}. Irisarri et al. ¹⁸ atribuyen este evento a la liberación del N_2O atrapado en el suelo y a las condiciones redox óptimas para la producción de N_2O . Por otro lado, el aumento en la emisión de N_2O a la madurez del cultivo podría deberse al aumento en la

mineralización del N ⁴² que coincide con el mayor PMN y contenido de N mineral (Fig. 1) en el suelo de Salto. La mayor disponibilidad de N mineral en el suelo podría estimular los procesos de nitrificación y desnitrificación implicados en la producción de N₂O.

Si bien se observaron flujos promedios negativos en algunos de los muestreos, la alta variabilidad de las emisiones no permitió detectar diferencias entre las distintas fechas. Majumdar ²⁹ revisó la capacidad de los suelos de arrozales de actuar como sumideros de N₂O y encontró mayor capacidad de consumo de N₂O en suelos inundados. En contraste con estos resultados, ensayos previos en Treinta y Tres evidenciaron picos de N₂O en la etapa vegetativa del arroz ^{18 and 39}. Si bien en este estudio se consideraron los posibles momentos con máxima emisión, no pudieron observarse esos picos en los momentos de muestreo.

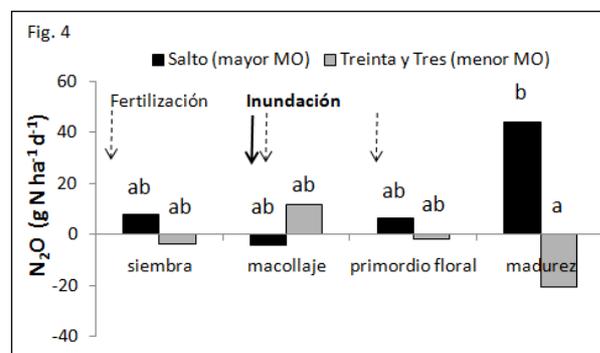


Figura 4. Flujo de N₂O del cultivo de arroz en suelo de Salto y Treinta y Tres. Cada barra corresponde a la media del flujo calculado a partir de cuatro cámaras estáticas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre suelos ($p < 0,05$).

No se encontró correlación entre el NO₃⁻ ni el N mineral del suelo con el flujo de N₂O, pero sí con el NMP de desnitrificantes (Tabla 2). Si bien el NO₃⁻ es el aceptor de electrones en la desnitrificación, una correlación positiva entre el NO₃⁻ del suelo y

la emisión de N₂O no siempre es esperable, ya que NO y N₂ también son producidos en este proceso y existen múltiples factores como la heterogeneidad espacial del suelo y la diversidad microbiana que explican la dinámica de los procesos involucrados.

Hou et al. ¹⁷ no encontraron correlación entre la emisión de N₂O y el NMP de desnitrificantes mientras que Das y Adhya ¹⁰ encontraron una correlación positiva entre el N₂O emitido y la actividad y número de nitrificantes y desnitrificantes.

Tabla 2. Correlaciones entre parámetros bioquímicos y microbiológicos de suelos cultivados con arroz.

Parámetros bioquímicos y microbiológicos	N ₂ O	NMP Desnitrificantes	NMP Oxidantes de NH ₄ ⁺	AO- de NH ₄ ⁺	AED	MN	NO ₃ ⁻
NH ₄ ⁺	0,25	0,52	0,25	-0,02	-0,24	0,25	-0,34
NO ₃ ⁻	0,23	0,04	-0,16	-0,26	-0,06	-0,24	—
Mineralización de N (MN)	-0,08	0,09	0,42*	0,06	-0,05	—	—
Actividad enzimática desnitrificante (AED)	-0,25	-0,07	-0,11	-0,14	—	—	—
Actividad oxidante de NH ₄ ⁺ (AO-NH ₄ ⁺)	-0,14	-0,07	-0,18	—	—	—	—
NMP de Oxidantes de NH ₄ ⁺	0,05	0,03	—	—	—	—	—
NMP de Desnitrificantes	0,53**	—	—	—	—	—	—

Sin símbolo: no significativo

* p<0,05

** p<0,01

Como conclusión, el suelo de Salto, con mayor contenido de MO, presentó un mayor potencial de desnitrificación, NMP de desnitrificantes y emitió mas N₂O a la madurez del cultivo que coincidió con un mayor PMN y contenido de N mineral. El NMP de desnitrificantes fue un buen indicador de su actividad potencial, y a su vez se correlacionó con los flujos de N₂O. Las correlaciones entre los parámetros

microbianos y la emisión de N_2O podrían ser útiles para la predicción de los flujos de este gas en el cultivo de arroz.

Los estudios de emisiones de GEI se han concentrado en Uruguay en la zona de Treinta y Tres, tradicional para el cultivo de arroz. En este trabajo se comprobó que el suelo de Salto presentó un comportamiento diferente, lo que estimula a estudiar otros tipos de suelos para generar mayor información que contribuiría en la elaboración del inventario nacional de GEI y el cálculo de la huella de C del arroz uruguayo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por CSIC UdelaR (proyecto I+D, responsable P.I.) y por una Beca de Maestría (ANII) a G.I. Agradecemos a J. Terra (INIA Treinta y Tres) y a B. Bocking por los ensayos de campo y a G. Pérez, G. Gordillo y P. Gutiérrez por su colaboración con los ensayos de laboratorio. También agradecemos a S. Tarlera y L. Frioni por sus comentarios sobre el trabajo.

Bibliografía

- 1 ACA (Asociación de Cultivadores de Arroz). Informe Arroceros de Uruguay XXI. [Online] <http://www.aca.com.uy/datos-estadisticos>. Consultado el 6 de julio de 2015.
- 2 Adviento-Borbe MA, Padilla GN, Pittelkow CM, Simmonds M, van Kessel C, Linquist B. Methane and nitrous oxide emissions from flooded rice systems following the end-of-season drain. *J Environ Qual*. 2015; 44: 1071-1079.
- 3 Alef K, Nannipieri P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press. 1995. p. 570-576.
- 4 Altamirano A, Da Silva H, Durán A, Echevarría A, Panario D, Puentes R. Carta de reconocimiento de suelos del Uruguay: Tomo I: Clasificación de suelos. Montevideo: Ministerio de Agricultura y Pesca. 1976. p. 97.
- 5 Ando H, Aragonés RC, Wada G. Mineralization pattern of soil organic N of several soils in the tropics. *Soil Sci Plant Nutr*. 1992; 2: 227-234.
- 6 Azzíz G, Trasante T, Monza J, Irisarri P. The effect of soil type, rice cultivar and water management on ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations. *Appl Soil Ecol*. 2016; 100: 8-17.
- 7 Bakken LR, Bergaust L, Liu B, Frostegard A. Regulation of denitrification at the cellular level: a clue to the understanding of N₂O emissions from soils. *Philos Trans. R. Soc. B Biol. Sci*. 2012; 367: 1226–1234.
- 8 Belser LW, Mays EL. Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and

- its use in assessing nitrification in soils and sediments. *App Env Microbiol.* 1980; 39: 505-510.
- 9 Boyle-Yarwood S, Bottomley PJ, Myrold DD. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environ Microbiol.* 2008; 11: 2956-65.
 - 10 Das S, Adhya TK. Effect of combine application of organic manure and inorganic fertilizer on methane and nitrous oxide emissions from a tropical flooded soil planted to rice. *Geoderma.* 2014; 213: 185-192.
 - 11 Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG., Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL. [Online] <http://www.infostat.com.ar>
 - 12 Ghosh P, Kashyap AK. Effect of rice cultivars on rate of N-mineralization, nitrification and nitrifier population size in an irrigated rice ecosystem. *Appl Soil Ecol.* 2003; 1: 27–41.
 - 13 Glaser K, Hackl E, Inselsbacher E, Strauss J, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A. Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010; 3: 575-591.
 - 14 Groffman PM, Butterbach-Bahl K, Fulweiler RW, Gold AJ, Morse JL, Stander EK, Tague CL, Tonitto C, Vidon P. Challenges to incorporating spatially and temporally explicit phenomena (hotspots and hot moments) in denitrification models. *Biogeochemistry.* 2009; 93: 49-77.

- 15 Guynot ME, Toribio A, Quevedo M, Muxí L. Microflora of dissimilitative nitrate reduction in a denitrifying reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998; 50:396-400.
- 16 Hernández J, Berger A. Investigaciones Agronómicas. Reporte Técnico Anual – Área Cultivos – Programa Nacional de Arroz. INIA. 2003, p. 34-40.
- 17 Hou AX, Chen GX, Wang ZP, Van Cleemput O, Patrick WH Jr. Methane and nitrous oxide emissions from rice field in relation to soil redox and microbiological processes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2000; 64: 2180-186.
- 18 Irisarri P, Pereyra V, Fernández A, Terra J, Tarlera S. CH₄ and N₂O emissions in a rice field: first measurements in the Uruguayan productive system. *Agrociencia Uruguay.* 2012; 16:1-10.
- 19 Irisarri P, Perdomo C. *Emisiones de gases de efecto invernadero por suelos agrícolas.* En: Emisiones de metano y óxido nitroso: Principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario en Uruguay. Irisarri P, editor. Universidad de la República, Montevideo, 2009, p. 1-29.
- 20 Irisarri P, Gonnet S, Deambrosi E, Monza J. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007; 2: 237-242.
- 21 Kader MA, Sleutel S, Begum SA, Moslehuddin AZM. Nitrogen mineralization in sub-tropical paddy soils in relation to soil mineralogy, management, pH, carbon, nitrogen and iron contents. *Eur J Soil Sci.* 2013; 1: 47-57.
- 22 Kandeler E. *Potential Nitrification.* En: Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E,

- Margesin, R editors. *Methods in Soil Biology*. Berlin, Springer-Verlag. 1996a, p. 146-149.
- 23 Kandeler E. *N-Mineralization Under Waterlogged Conditions*. En: Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. editors. *Methods in Soil Biology*. Berlin, Springer-Verlag. 1996b, p. 141-143.
- 24 Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol*. 2001;1: 485-529.
- 25 Kravchenko IK, Yu K. Relationship between major soil properties and culturable microorganisms affecting CH₄ and N₂O dynamics in rice soils. *Arch Agron Soil Sci*. 2006; 6: 607–615.
- 26 Lan T, Han Y, Cai Z. Denitrification and its product composition in typical Chinese paddy soils. *Biol Fert Soils*. 2015; 1: 89-98.
- 27 Li YK, Li B, Guo WZ, Wu XP. Effects of nitrogen application on soil nitrification and denitrification rates and N₂O emissions in greenhouse. *J Agr Sci Tech*. 2015;2: 519-530.
- 28 Lindau CW, Bollich PK, Delaune RD, Patrick WH, Law VJ. Effect of urea fertilizer and environmental factors on CH₄ emissions from a Louisiana, USA rice field. *Plant Soil*. 1991; 136:195-203.
- 29 Majumdar D. Biogeochemistry of N₂O uptake and consumption in submerged soils and rice fields and implications in climate change. *Crit Rev Env Sci Tec*. 2013; 43: 2653–2684.
- 30 Morley NJ, Richardson DJ, Baggs EM. Substrate induced denitrification over

- or underestimates shifts in soil N_2/N_2O ratios. *Plos One* 2014;9 | e108144.
- 31 Mulvaney RL. Chemical Methods Nitrogen - inorganic forms. En: *Methods of Soil Analysis : Part 3*. Soil Sci Soc of Am, Inc., Madison, WI. 1996, p. 1162-171.
- 32 Perdomo C, Irisarri P, Ernst O. Nitrous oxide emissions from an Uruguayan argiudoll under different tillage and rotation treatments. *Nutr Cycl Agroecosyst*. 2009; 84:119-128.
- 33 Rhine ED, Mulvaney RL, Pratt EJ, Sims GK. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Sci Soc Am J*. 1998; 2: 473-480.
- 34 Schmidt EL, Belser LW. *Methods of soil analysis. Part 2*. Am Soc of Agronomy, Madison, WI. 1994, p.253–288.
- 35 Sher Y, Zaady E, Nejidat A. Spatial and temporal diversity and abundance of ammonia oxidizers in semi-arid and arid soils: indications for a differential seasonal effect on archaeal and bacterial ammonia oxidizers. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013; 3: 544-556.
- 36 Smith K, Ball T, Conen F, Dobbie K, Massheder J, Rey A. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *Eur J Soil Sci*. 2003; 54: 779-791.
- 37 Smith Z, McCaig AE, Stephen JR, Embley TM, Prosser JI. Species diversity of uncultured and cultured populations of soil and marine ammonia oxidizing bacteria. *Microb Ecol*. 2001; 3: 228-237.

- 38 Subbarao G, Ito O, Sahrawat K, Berry W, Nakahara K, Ishikawa T, Watanabe T, Suenaga K, Rao I. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—Challenges and opportunities. *Crit Rev Plant Sci.* 2006; 25: 303-335.
- 39 Tarlera S, Capurro MC, Irisarri P, Fernández A, Roel A. Yield-scaled global warming potential of two irrigation managements in a highly productive rice system. *Sci Agric.* 2016; 73: 43-50.
- 40 Tiedje. *Denitrifiers*. En: *Methods of soil analysis. Part 2.* Soil Sci Soc of Am, Inc., Madison, WI. 1994, p. 245–267.
- 41 Vityakon P, Dangthaisong N. Environmental influences on nitrogen transformation of different quality tree litter under submerged and aerobic conditions. *Agrofor. Syst.* 2005; 63: 225–236.
- 42 von Arnold K, Nilsson M, Hånell B, Weslien P, Klemedtsson L. Fluxes of CO₂, CH₄ and N₂O from drained organic soils in deciduous forests. *Soil Biol Biochem.* 2005; 37: 1059–1071.
- 43 Wang S, Wang Y, Feng X, Zhai L, Zhu G. Quantitative analyses of ammonia-oxidizing Archaea and bacteria in the sediments of four nitrogen-rich wetlands in China. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 2: 779-787.
- 44 Watanabe T, Chairaj P, Tsuruta H, Masarngsan W, Wongwiwatchai C, Wonprasaid S, Cholitkul W, Minami K.. Nitrous oxide emissions from fertilized upland fields in Thailand. *Nutr Cycl Agroecosys.* 2000; 58: 55-65.
- 45 Wertz S, Leigh AK, Grayston SJ. Effects of long-term fertilization of forest

- soils on potential nitrification and on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 1: 142-154.
- 46 Wu Y, Ke X, Hernández M, Wang B, Dumont MG, Jia Z, Conrad R. Autotrophic growth of bacterial and archaeal ammonia oxidizers in freshwater sediment microcosms incubated at different temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(9): 3076–3084.
- 47 Yang Y, Zhang J, Cai Z. Nitrification activities and N mineralization in paddy soils are insensitive to oxygen concentration. *Acta Agric Sc and B Soil Plant Sci.* 2016; 3: 272-281.
- 48 Yeasmin S, Islam AKM M, Islam AA. Nitrogen fractionation and its mineralization in paddy soils: a review. *J Agr Sci Tech.* 2012; 3: 775-793.
- 49 Yin C, Fan F, Song A, Li Z, Yu W, Liang Y. Different denitrification potential of aquatic brown soil in Northeast China under inorganic and organic fertilization accompanied by distinct changes of *nirS* - and *nirK* -denitrifying bacterial community. *Eur J Soil Biol.* 2014; 65: 47–56.
- 50 Yu KW, Patrick WH. Redox window with minimum global warming potential contribution from rice soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2004; 68: 2086-091.