

IMPACTO DE LA APLICACIÓN PROLONGADA DE UREA SOBRE BACTERIAS NITRITANTES DE UN ARGIJUDOL TÍPICO, ARGENTINA

MÓNICA FABIOLA BOCCOLINI^{1*}; LAURA ANA BASILE²; CRISTIAN ROMÁN CAZORLA¹;
CARLOS MARTÍN GALARZA¹; BELÉN CONDE¹ & EVA LUCÍA MARGARITA FIGUEROLA³

Recibido: 07-07-15

Recibido con revisiones: 13-10-15

Aceptado: 15-10-15

RESUMEN

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

Palabras clave. Fertilización nitrogenada, Propiedades químicas del suelo, Comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco, Electroforesis en gel de gradiente desnaturante.

IMPACT OF THE LONG APPLICATION OF UREA ON BACTERIA NITRITANTES OF A TYPICAL ARGIJUDOL, ARGENTINE

ABSTRACT

Ammonia oxidation to nitrite is a critical step in the nitrogen (N) cycle and is performed by ammonia-oxidizing bacteria (AOB) also called Nitrifying. Agricultural management can affect the AOB community due to the prolonged use of nitrogen fertilizers such as urea which tend to increase soil acidity. After 12 years of urea application, size, activity, AOB composition and chemical variables were investigated. The performed field experiment had a complete randomized block design with three replicates on a typical Argjudol soil located in Marcos Juárez, Southeastern Córdoba, Argentine. The treatments were: A control without N-application; B and C with 95 and 165 kg ha⁻¹ of urea as the N source respectively. Soil samples were collected before sowing and after corn harvest. The AOB community was studied through the most probable number method, shaken soil slurry, polymerase chain reaction and electrophoresis in denaturing gradient gel. Urea fertilization decreased soil pH, increased AOB abundance and diversity but did not significantly affect nitrifying potential. Bacterial community structure was dominated by members of the Group 3 of *Nitrosospira* in all the treatments. The results showed that the long-term urea fertilization in a typical Argjudol was a substrate source and not a limiting factor for the nitrifying bacteria. The fertilization effect was more evident in the sampling date before corn sowing.

Key words. Nitrogen fertilization, Soil chemical properties, Community of ammonia-oxidizing bacteria, Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE).

1 Estación Experimental Agropecuaria INTA Marcos Juárez

2 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Universidad Nacional de San Martín

3 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Héctor Torres"

*Autor de contacto: boccolini.monica@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN

La nitrificación es el proceso final de la mineralización de la materia orgánica nitrogenada (Orozco 1999, citado en Miller Gallego, 2012) donde ocurre la oxidación biológica del amoníaco (NH_3) a nitrato (NO_3^-). Las bacterias oxidantes de amoníaco (BOA), o nitrificantes son microorganismos quimioautótrofos que utilizan la oxidación de amoníaco (NH_3) a nitrito (NO_2^-) como fuente de energía, jugando un rol fundamental en el ciclo del nitrógeno (N) en suelos. La nitrificación genera el sustrato para los procesos de pérdidas de N por lavado de NO_3^- y desnitrificación (Kowalchuk & Stephen, 2001) pudiendo tener efectos negativos para el medio ambiente por ocasionar la contaminación del agua subterránea o la generación de gases de efecto invernadero.

Las BOA conforman un grupo funcional utilizado frecuentemente como modelo en ecología microbiana para estudiar el impacto de las actividades antrópicas sobre los microorganismos del suelo (Noe & Abril, 2015; Enwall *et al.*, 2007; Kowalchuk & Stephen, 2001). Si bien las arqueas oxidantes de amoníaco (AOA) son también capaces de llevar a cabo la oxidación del NH_3 , se considera que las BOA demuestran una mayor respuesta a prácticas de fertilización nitrogenada en estudios a largo plazo con respecto a las AOA (Shen *et al.*, 2008; Ai *et al.*, 2013).

Para caracterizar la estructura de la comunidad de bacterias nitrificantes, los métodos moleculares, y en particular, el análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante, en inglés *DGGE*, ha sido ampliamente utilizado en diferentes estudios, incluyendo suelos con manejo de fertilización (Ai *et al.*, 2013; Enwall *et al.*, 2007; Nicolaisen & Ramsing, 2002).

La fertilización es mundialmente utilizada para aumentar el rendimiento de los cultivos, afectando las propiedades bioquímicas y biológicas del mismo (Ai *et al.*, 2013). En particular, el uso de fertilizantes nitrogenados puede influenciar enormemente la disponibilidad de N y el pH del suelo (Ciarlo & Palma, 2011). La magnitud del efecto acidificante por fertilización nitrogenada a largo plazo dependerá de factores como el manejo de fertilización, tipo de suelo y clima (Chien *et al.*, 2008).

En suelos Argiudoles de la región Pampeana el elevado contenido de materia orgánica del suelo (MOS), entre 2 y 4% y la saturación de bases en el complejo, superior al 50%, permitirían atenuar el efecto acidificante de la aplicación de fertilizantes nitrogenados debido a su capacidad buffer (Iturri *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011). En la zona este de la provincia de Córdoba perteneciente a la región Pam-

peana Ondulada domina la actividad agrícola y el manejo de fertilización depende de muchos factores, siendo el económico en términos de producción, el más importante (Lavado, 2010).

Es bien sabido que, los diferentes sistemas de labranza, la fertilización mineral y los rastros de cultivos afectan a la comunidad de BOA (Yu *et al.*, 2010). Numerosos estudios a campo en diferentes suelos han estudiado el efecto de la aplicación prolongada de fertilizantes nitrogenados sobre la comunidad de las BOA y su estructura. El efecto de la aplicación de fertilizantes nitrogenados sobre el pH edáfico es determinante, debido a la implicancia de esta variable ambiental sobre la comunidad de BOA (Enwall *et al.*, 2007; Ward, 2008; Nicol *et al.*, 2008)

Shen *et al.* (2008); Yu *et al.* (2010) y Ai *et al.* (2013) observaron que en suelos de textura fina ácidos o moderadamente ácidos y de textura gruesa alcalinos, el uso de urea afectó positivamente a las BOA aumentando la abundancia y diversidad con cambios en la estructura de la comunidad. Mientras que, cuando se aplicó sulfato de amonio en suelos ligeramente ácidos, los efectos sobre dicha comunidad fueron negativos (He *et al.*, 2007; Enwall *et al.*, 2007).

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se han reportado trabajos que caractericen a la comunidad de bacterias nitrificantes en suelos con buena capacidad buffer como los Argiudoles de la zona en estudio fertilizados con urea a largo plazo.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la comunidad de bacterias oxidantes del amoníaco en un ensayo de larga duración, teniendo en cuenta los efectos del manejo de fertilización sobre las propiedades químicas del suelo y rastros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del ensayo y diseño experimental

El trabajo se realizó en un ensayo establecido en 1993 en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Marcos Juárez (32° 41' de latitud Sur y a 62° 7' longitud Oeste) ubicado sobre un suelo clasificado como un Argiudol típico de textura franco-limoso, con un 3,26% de materia orgánica (MO) y N total de 1,8 g kg⁻¹ de suelo. El pH es de 6,4 clasificado como ligeramente ácido (González *et al.*, 2011); la CIC 19,3 cmol_c kg⁻¹ y una saturación de bases de 91% (INTA, 1978). La secuencia de cultivos usada en la rotación es maíz-trigo/soja de segunda-soja de primera bajo siembra directa continua. El diseño consistió en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Los tratamientos fueron: Control, sin aplicación de urea (A); con 90 (B) y 165 (C) kg ha⁻¹ de N como urea por año. Además se consideró una pastura natural como situa-

ción de referencia (SR). Se realizaron dos muestreos: previo a la siembra de maíz (con rastrojo de soja^{1ra} en superficie) el 18/10/2010 y en postcosecha (con rastrojo de maíz) el 27/06/2011.

Recolección y acondicionamiento de las muestras

Las muestras de suelo fueron recolectadas de 0-10 cm de profundidad con barreno 2,5 cm de diámetro tomando 30 submuestras por parcela conformando una muestra compuesta. Conjuntamente se recolectaron rastrojos con aro de 21 cm de diámetro juntando 6 submuestras por parcela para una muestra compuesta.

Las muestras de suelo húmedas fueron conservadas a 4 °C hasta su procesamiento con tamiz de 2 mm. Las determinaciones de abundancia de BOA, actividad o potencial de nitrificación de suelo (PNS), contenido de N-NO₃⁻ (N de nitrato) y N-NH₄⁺ (N de amoníaco) fueron realizadas en húmedo, mientras que, las determinaciones de MOS, pH, carbono (C) y N de la materia orgánica particulada (N-MOP) e incubación anaeróbica se realizaron con muestra seca. Además, se determinó el contenido de humedad gravimétrica utilizando la densidad aparente de los primeros 10 cm de suelo. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de suelo húmedo conservado a -20 °C y las extracciones fueron posteriormente almacenadas a la misma temperatura.

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

Determinaciones químicas

El contenido de C y N de los rastrojos se cuantificó mediante el método de Combustión en seco (Merry & Spouncer, 1998) con analizador LECO TrusPec CN.

El contenido de MO del suelo (MOS) se estimó a partir del porcentaje de C orgánico (CO) (Gasparoni, 2008) mediante el método titulométrico (Walkley & Black (1934). Para la determinación de la MOP, se realizó el fraccionamiento por tamaño de partículas con tamiz de 106 µm según Cambardella & Elliott (1992). Se determinó el contenido de C y N de la MOP siguiendo el mismo procedimiento que para rastrojos.

Las mediciones de pH se realizaron de acuerdo a una relación suelo-agua de 1: 2,5 (IRAM, 29410. 1999). El contenido de N-NO₃⁻ se determinó mediante el método del ácido Fenoldisulfónico (Bremner, 1965) y el de N-NH₄⁺ por microdestilación directa por arrastre de vapor (Keeney, 1982).

Determinaciones microbiológicas

El N potencialmente mineralizable del suelo proviene principalmente de la fracción de MOP (Frabrizzi *et al.*, 2003) y su estimación se realizó a través del método de Incubación anaeróbica de suelo (Echeverría *et al.*, 2000). Dicho método propuesto por Gianello & Bremner (1986), llamado N anaeróbico

(Nan) consiste en la determinación de NH₄⁺ producido luego de una incubación de suelo durante siete días a 40 °C en anaerobiosis. La cantidad de NH₄⁺ se cuantificó por microdestilación por arrastre de vapor (Keeney, 1982).

La abundancia de las BOA se estimó a través del método de recuento del número más probable (NMP) (Alexander, 1965) en medio líquido selectivo con (NH₄)₂SO₄ y CaCO₃ (Frioni, 2006). Los medios fueron incubados durante 28 días a 29 °C. La actividad enzimática se determinó a través del potencial de nitrificación de suelo (PNS) por el método *Shaken Soil Slurry* según (Drury *et al.*, 2008). El contenido de NO₃⁻ generado en intervalos de tiempo a las 0, 2, 6, 12, 22 y 24 h se cuantificó con el método del ácido Fenoldisulfónico. La tasa de nitrificación fue determinada por regresión lineal de las concentraciones de N-NO₃⁻ en el tiempo (h) y la pendiente fue utilizada para determinar el PNS por día (d).

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

La extracción de ADN se realizó a partir de 0,5 g de suelo con kit Fast DNA SPIN para suelo (MP Biomedicals). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en agarosa al 1% y la concentración mediante mediciones de absorbancia a 260 nm. Para la amplificación específica del gen 16S ARNr de las BOA se realizó una *nested-PCR* (Zhang *et al.*, 2010a citado en Ai *et al.*, 2013). En la primera amplificación se utilizaron *primers* específicos para las BOA, CTO F189 y R654 que amplifican una región de 465 pb (Kowalchuck *et al.*, 1997). El producto generado fue utilizado como templado para la segunda amplificación con los *primers* F341-GC y R534 (Muyzer *et al.*, 1993). Las condiciones de amplificación fueron según (Muyzer *et al.*, 1993). Todos los productos PCR fueron chequeados en agarosa al 1% para verificar su tamaño y calidad. Posteriormente, los amplicones fueron separados por *DGGE*. Se prepararon geles de poliacrilamida al 8% conteniendo un gradiente lineal desnaturante de 35 a 60% (donde el 100% de desnaturante contiene urea 7M y formamida 40% v/v). Luego se sembraron 38 µL del producto de PCR por calle. Las condiciones de electroforesis fueron a 60 V durante 16 h a 60 °C. Los geles fueron teñidos con GelRed en TAE 1X durante 30 min y visualizados bajo luz UV. Los perfiles *DGGE* fueron digitalizados y analizados con el *software* Gel Compare II (Applied Maths). La posición y la intensidad de las bandas fueron utilizadas para el cálculo de diversidad de las muestras (mediante el índice de Shannon-Weaver (H')) y análisis de conglomerados (AC).

Secuenciación y análisis filogenético

Las bandas más destacables en cuanto a la aparición e intensidad en los tratamientos en el *DGGE*, fueron aisladas, reamplificadas y sus productos fueron secuenciados. Las secuencias fueron comparadas con las existentes en la *GenBank database* del *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) usando el algoritmo BLAST. A partir del alineamiento se construyó un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución Kimura 2 (Kimura *et al.*, 1980) del *software* Mega (Tamura *et al.*, 2013). La evaluación estadística de la topología obtenida se realizó mediante un análisis de bootstrap (100 réplicas).

Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos químicos y biológicos se utilizó el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2014). Se aplicó un Modelo Lineal Mixto, tomando como efecto fijo los tratamientos de fertilización y como efectos aleatorios, las épocas de muestreo y repeticiones de campo. Cuando existieron diferencias significativas en las variables medidas se realizó la prueba de comparación de medias mediante LSD Fisher con significancias del 5%. Las correlaciones entre las variables químicas y biológicas se obtuvieron mediante el Índice de Pearson. Para garantizar la independencia de los datos, las correlaciones fueron realizadas en cada muestreo por separado. Se informan sólo aquellas consistentes en ambas fechas y estadísticamente significativas. Además, el análisis de correlación de Pearson también fue aplicado para estudiar la relación entre el pH y las bandas estudiadas. La SR no se incluyó en los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Propiedades químicas de los rastrojos y suelo

La fertilización prolongada con urea incrementó significativamente ($P < 0,05$) la cantidad de rastrojos y de

MOS. No se detectaron diferencias ($P > 0,05$) en la cantidad de MOP (Tabla 1). El contenido de Nan disminuyó a medida que se incrementó la cantidad de urea aplicada, siendo significativas sólo las diferencias entre el control y la dosis mayor ($P < 0,05$). El pH del suelo también disminuyó en respuesta al agregado de fertilizante, presentando diferencias significativas entre dosis ($P < 0,05$) (Tabla 1). Los contenidos de N-NH_4^+ y N-NO_3^- del suelo también fueron afectados ($P < 0,05$); el N-NH_4^+ fue 22% mayor en B con respecto al A, mientras que C no se diferenció de A y B. El contenido de N-NO_3^- aumentó un 27% en C con respecto al tratamiento A, el que a su vez no se diferenció significativamente de B (Tabla 1).

Abundancia, diversidad de la comunidad de las BOA y actividad potencial

La abundancia de BOA fue afectada significativamente ($P < 0,05$) por la aplicación de urea, aunque no hubo diferencias entre dosis. El NMP de BOA incrementó un 12% en el tratamiento B y un 10% en tratamiento C con respecto al control A (Tabla 2). También la diversidad de BOA fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los fertilizados. No obstante, el análisis del PNS indica una tendencia decreciente con la dosis de urea que no resultó significativa ($P > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 1. Cantidad y calidad de rastrojos de cosecha; MOP (Materia Orgánica Particulada); MOS (Materia Orgánica de Suelo); Nan (Nitrógeno anaeróbico); acidez del suelo (pH); N-NO_3^- ; N-NH_4^+ en los tratamientos: A (Sin N); B (90 kg N ha⁻¹) y C (165 kg N ha⁻¹). SR: Situación de Referencia. Dichos valores fueron estimados por Modelo Lineal Mixto considerando a los muestreos como un factor aleatorio.

Table 1. Quantity and quality of crop residues; MOP (Particulate Organic Matter); MOS (Soil Organic Matter); Nan (anaerobic nitrogen); soil acidity (pH); N-NO_3^- and N-NH_4^+ under treatments: A (without N); B (90 kg N ha⁻¹) and C (165 kg N ha⁻¹). SR: Reference soil. These values were estimated by linear mixed model considering the sampling as a random factor.

TRAT.	Rastrojos				MOP				MOT (Mg ha ⁻¹)	Nan (mg N-NH ₄ ⁺ kg ⁻¹)	pH	N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹)
	Cant.	C (Mg ha ⁻¹)	N	C/N	Cant.	C (Mg ha ⁻¹)	N	C/N					
A	5,97b	1,70b	0,05b	39,2	9,62	1,96	0,13	14,6	34,08b	53,98a	5,83a	11,48b	2,35b
B	8,06a	2,65a	0,08a	37,7	10,56	2,21	0,15	14,5	36,44a	51,24ab	5,43b	12,59b	3,02a
C	8,30a	2,94a	0,08a	39,0	9,51	2,06	0,14	14,2	36,46a	46,55b	5,16c	15,85a	2,68ab
P valor	0,006	0,004	0,003	NS	NS	NS	NS	NS	0,030	0,029	<0,0001	0,002	0,048
SR	7,31	2,12	0,12	17,9	17,97	4,09	0,28	14,9	48,36	128,94	6,13	12,02	15,32

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

Letters refer to significant differences ($P < 0,05$) by Fisher LSD.

Tabla 2. Valores de abundancia y diversidad (H') de BOA y potencial de nitrificación de suelo (PNS) con el error estándar en los diferentes tratamientos de fertilización y SR (Situación de Referencia).

Table 2. Abundance and diversity values (H') of BOA and Soil Nitrification Potential (PNS) and standard error in different fertilization treatments and SR (Soil of Reference).

TRAT.	Abundancia	PNS	H'
	(log ₁₀ n° bact g ⁻¹)	(mg N-NO ₃ ⁻ kg ⁻¹ d)	-
A	2,65 ± 0,09 b	7,64 ± 1,56	2,74 ± 0,05 b
B	3,01 ± 0,09 a	6,52 ± 0,9	2,84 ± 0,04 a
C	2,96 ± 0,09 a	6,12 ± 0,72	2,83 ± 0,04 a
P valor	<0,0001	NS	<0,0001
SR	3,03 ± 0,22	7,56 ± 0,12	2,58 ± 0,22

Letras distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) según LSD de Fisher. Letters refer to significant differences (P < 0,05) by Fisher LSD.

Correlaciones entre las propiedades químicas y las BOA

El análisis del coeficiente de correlación de Pearson mostró la existencia de correlaciones positivas y significativas entre H' y el N de la MOP en ambos muestreos; detectándose una correlación con un R² = 0,75; P = 0,02 en presiembr y un R² = 0,89; P = 0,001 en postcosecha.

Estructura de la comunidad de las BOA

La estructura de la comunidad fue caracterizada por DGGE. El análisis se realizó por separado para cada muestreo ya que las muestras correspondientes fueron corridas en

sendos geles. Los perfiles de banda variaron entre tratamientos en ambos muestreos. En presiembr (Fig. 1a), la fertilización provocó un aumento en la riqueza y cambios en la intensidad de las bandas del DGGE. Las bandas 2, 10 y 11 fueron exclusivas de los tratamientos con fertilización; mientras que dos bandas (8 y 14) fueron propias del control. Adicionalmente, se detectaron diferencias en la intensidad de algunas bandas entre el control y los tratamientos. Las bandas 3, 4, 12 y 16 fueron más intensas en B y C, mientras que las bandas 7 y 19 presentaron un comportamiento opuesto. El test de Pearson reveló correlaciones negativas entre la abundancia de las bandas 2 y 16 con el pH (R² = -0,81; P = 0,004; R² = -0,76; P = 0,001, respectivamente); mientras que con la banda 19 la correlación con el pH fue positiva (R² = 0,91; P = 0,0001) indicando que a medida que disminuye el pH también lo hace esta población de BOA.

En postcosecha, se detectó menor variación en los perfiles entre los tratamientos evaluados (Fig. 2a) mostrando que la composición de la comunidad de BOA fue muy similar. Los resultados son confirmados por los dendrogramas de similitud del AC (Figs. 1b y 2b). En presiembr el tratamiento A se separó de B y C a un 85,1% de similitud. A su vez dentro de los fertilizados hubo discriminación entre dosis de fertilización. Por otra parte, en postcosecha, la estructura de las BOA presentó mayor similitud (93,5%) entre los patrones con respecto a presiembr, sin embargo, la variación estructural se mantuvo, mostrando la separación de B y C con respecto al tratamiento A.

Las bandas 6, 7, 12, 14, 15, 16 y 19 fueron seleccionadas del DGGE (Fig. 1a) y secuenciadas para determinar

Tabla 3. Bandas de BOA recortadas del DGGE, secuencias conocidas de mayor similitud en el Gen Bank, porcentaje de similitud y origen de las mismas. Table 3. AOB DGGE bands with closest matches in Gen Bank percentages of similarity, and sources of origin.

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

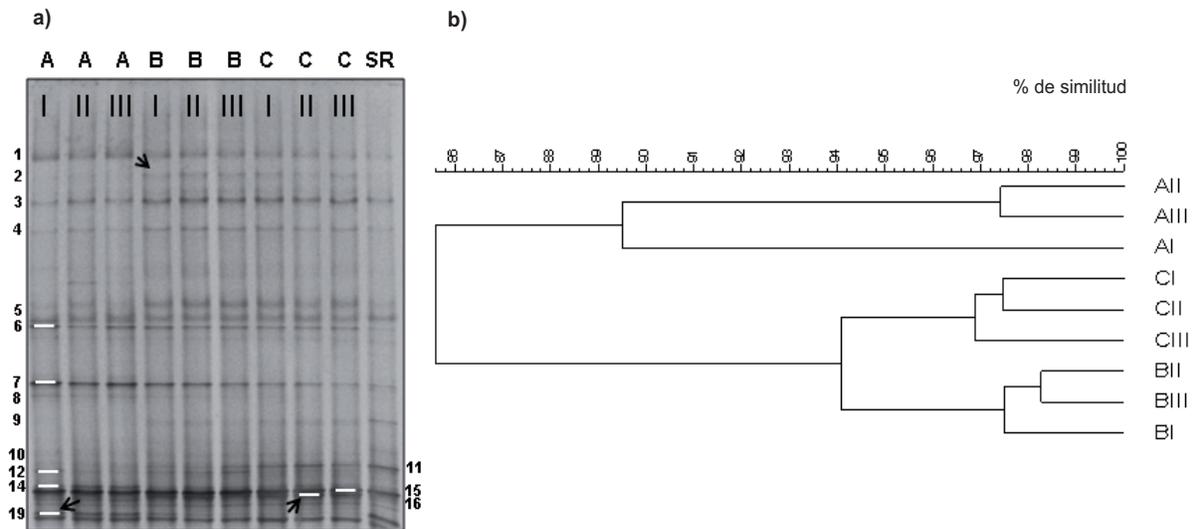


Figura 1. DGGE de BOA correspondiente al primer muestreo (presembrado de maíz) para los diferentes tratamientos de fertilización A: Sin N; B y C: con 90 y 165 kg N ha⁻¹ respectivamente y SR: Situación de Referencia (a); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson, expresado en porcentaje) (b). Las líneas blancas señalan las bandas secuenciadas y las flechas negras aquellas que correlacionan con el pH. Los números romanos representan las tres repeticiones de campo para cada tratamiento.

Figure 1. DGGE of BOA for the first sampling (prior to sowing of corn) with different fertilization treatments A: without N.; B and C: 90 and 165 kg N ha⁻¹ respectively and SR: Reference soil (a); and Dendrogram similarity (UPGMA and Correlation Coefficient of Pearson, expressed in percentage) (b). The white lines indicate the bands sequenced and black arrows indicate bands correlating with pH. Roman numerals denote the three field replicates for each treatment.

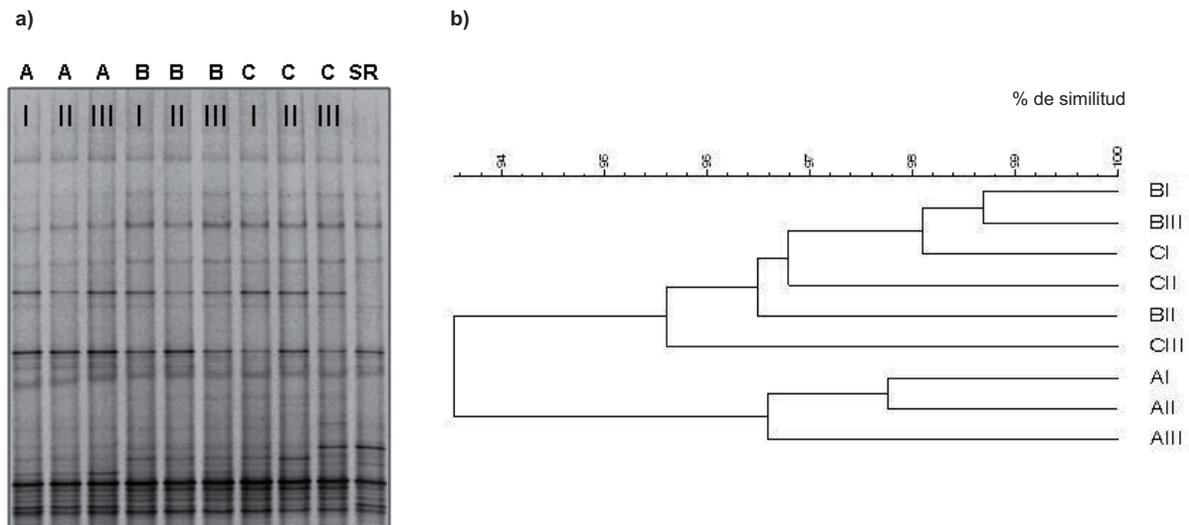


Figura 2. DGGE de BOA correspondiente al segundo muestreo (postcosecha de maíz) para los diferentes tratamientos de fertilización A: Sin N; B y C: con 90 y 165 kg N ha⁻¹ respectivamente y SR: Situación de Referencia (a); y Dendrograma de similitud (UPGMA y Coef. Correlación Pearson, expresado en porcentaje) (b). Los números romanos representan las tres repeticiones de campo para cada tratamiento.

Figure 2. DGGE of BOA for the second sampling (after harvesting of corn) in different fertilization treatments A: without N.; B and C: 90 and 165 kg N ha⁻¹ respectively and SR: Reference soil (a); and Dendrogram similarity (UPGMA and Correlation Coefficient of Pearson, expressed in percentage) (b). Roman numerals denote the three field replicates for each treatment.

su identidad y relaciones filogenéticas. El análisis reveló que dichas secuencias presentaron elevados porcentajes de identidad con cepas de las especies *Nitrosospira tenuis*, *Nitrosospira multiformis* mientras que dos fueron afines a secuencias de clones de β Proteobacterias oxidantes del amoníaco no cultivables (Tabla 3). Los perfiles DGGE estuvieron dominados por miembros del género *Nitrosospira* siendo la mayoría clasificadas como miembros del Grupo 3 de *Nitrosospira* (Fig. 3). No se detectaron afiliaciones filogenéticas con el género *Nitrosomonas*.

DISCUSIÓN

La aplicación de urea a largo plazo en un suelo Argiudol típico incrementó la abundancia y diversidad de las BOA en relación al tratamiento sin fertilizar, demostrando que el N aportado es un factor preponderante como sustrato frente a la acidificación causada por la fertilización.

El pH disminuyó en los tratamientos con urea en forma similar a lo informado en otros trabajos (Fabrizzi *et al.*, 1998; Divito *et al.*, 2011; Wyngaard *et al.*, 2012). Sin embargo, la abundancia, diversidad de las BOA y el potencial de nitrificación del suelo no fueron afectados negativamente por la acidificación del suelo. Esto concuerda con datos bibliográficos de suelos ligeramente ácidos y alcalinos donde se observó mayor abundancia (Biederbeck *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008) o un incremento en la diversidad de BOA (Chu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2013) al aplicar urea a largo plazo a pesar de la disminución en el pH edáfico.

Según Frioni (2006) el proceso de nitrificación se ve favorecido debido al elevado aporte de N por fertilización nitrogenada. En este estudio, el incremento de N aportado quedó demostrado por el mayor contenido de N-NH_4^+ detectado en las parcelas con aplicación de urea. El mismo resultado fue observado por Chen *et al.* (2011) y Yu *et al.* (2010) en ensayos de larga duración. El aumento N mineral encontrado en los tratamientos fertilizados, podría derivar tanto del aporte del fertilizante, como así también del mayor aporte por mineralización de los rastrojos, producto del incremento en el rendimiento agrícola asociado a la fertilización (Diovisalvi *et al.*, 2008). Según Nieder *et al.* (2010), además de los fertilizantes, los rastrojos de cultivos y MOS afectan la concentración de N-NH_4^+ en la solución del suelo.

En coincidencia con estudios previos en ensayos con fertilización nitrogenada a largo plazo (Divito *et al.*, 2011;

Gregorutti *et al.*, 2014), los tratamientos con urea generaron una disminución significativa del Nan, que representa una medida del N potencialmente mineralizable (Echeverría *et al.*, 2000; Fabrizzi *et al.*, 2003). Este efecto se atribuye a un aumento en la velocidad de mineralización de la MOP como consecuencia de la aplicación de N (Galantini *et al.*, 2008). No se detectó relación entre el N potencialmente mineralizable y las BOA, pero sí se observaron correlaciones positivas y significativas entre la diversidad de BOA con el N de la MOP, indicando que posiblemente a partir de su mineralización por microorganismos heterótrofos, actuaría favoreciendo a la comunidad nitrificante.

La concentración de N-NO_3^- aumentó en los tratamientos con urea al igual que en otros trabajos de fertilización nitrogenada a largo plazo (He *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010), pero la actividad nitrificante potencial no fue afectada. Resultados similares fueron publicados por Yu *et al.* (2010) al comparar suelos fertilizados con urea y un control sin fertilizar en ensayos de larga duración.

A pesar de no haberse detectado cambios significativos en el PNS, este mostró una tendencia decreciente que podría estar relacionada con la disminución del pH. La acidificación del suelo no afectó en forma negativa la abundancia y diversidad, pero es posible que haya generado una selección de especies tolerantes o acidófilas. Ha sido demostrado que las especies de BOA capaces de crecer en condiciones ácidas poseen una ureasa intracelular que les permite tomar urea directamente del medio, superando de esta manera el inconveniente de la protonación del amoníaco a pH bajos (Burton & Prosser, 2001; Pommerening-Röser & Koops, 2005). Esta capacidad les permite competir exitosamente en su ambiente, sin embargo, es posible que tengan una menor velocidad de oxidación dando lugar a un menor potencial de nitrificación en condiciones *in vitro*. Las correlaciones observadas entre algunas poblaciones de BOA y el pH reflejarían su adaptación o la falta de competitividad frente a la acidez del suelo. En forma similar, la selección de distintos linajes de BOA a lo largo de un gradiente de pH fue observada anteriormente por Nicol *et al.* (2008), y podría explicarse de acuerdo a Pommerening-Röser & Koops (2005) por los diferentes pHs óptimos para el transporte de urea de las distintas poblaciones.

La sensibilidad de la comunidad de las BOA frente a la aplicación de urea fue demostrada por los dendrogramas de similitud. Dicho análisis reveló que la estructura de la comunidad de las BOA fue afectada por la fertilización en

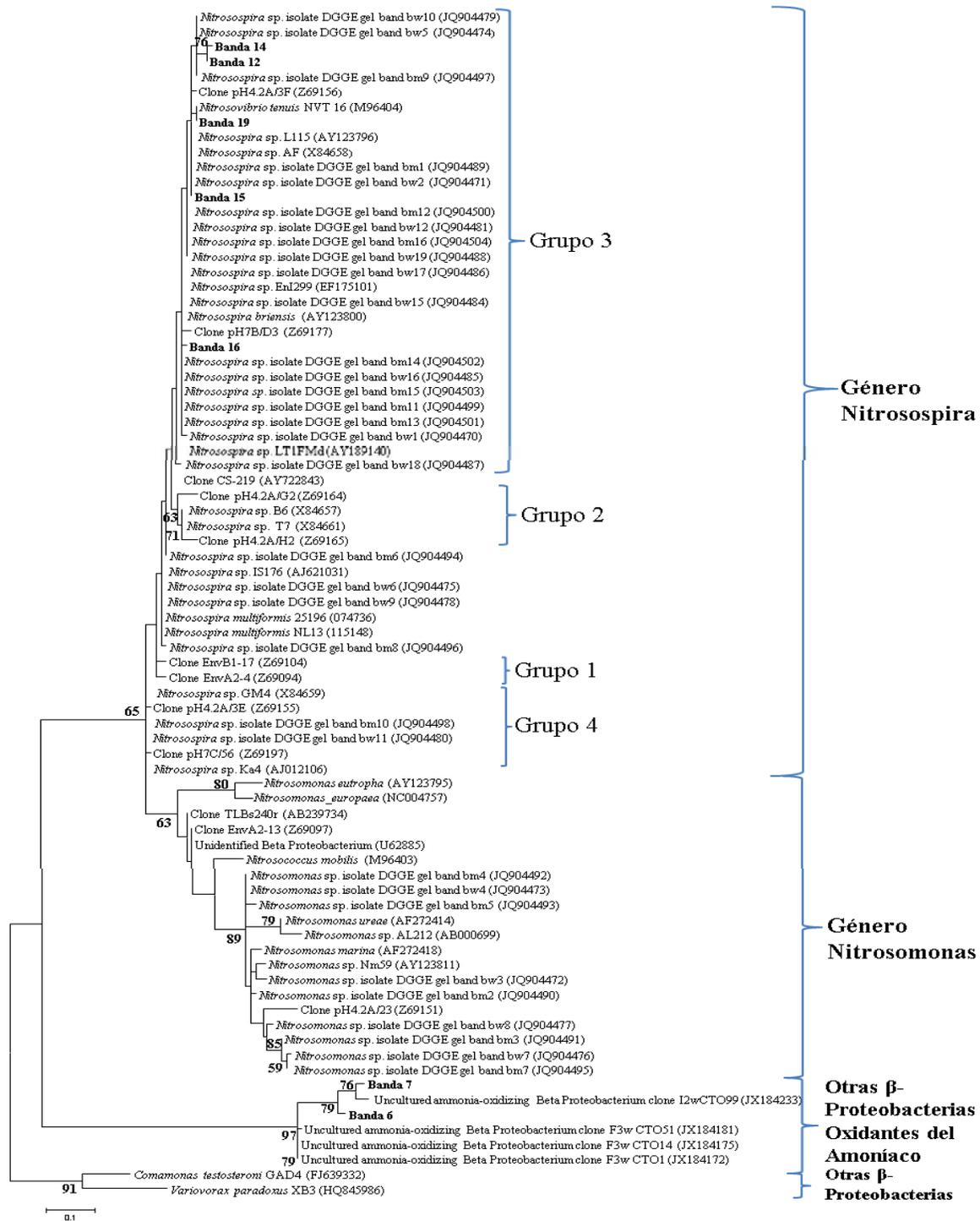


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias parciales del ADNr 16S de BOA, correspondientes a las bandas seleccionadas del DGGE y las secuencias con mayor similitud obtenidas de GenBank. Las secuencias correspondientes a este estudio se muestran en negrita. La escala indica % de sustituciones. Los valores *bootstrap* se muestran en los nodos.

Figure 3. Phylogenetic tree of partial AOB 16S rDNA sequences of DGGE selected bands in relation to 16S rDNA sequences of the closest uncultured and cultured relatives from genbank. Band sequences from this study are labeled in negrita. The scale bar indicates % nucleotide substitutions. Bootstrap values are reported at the nodes.

diferente magnitud de acuerdo a la época de muestreo. En presiembra, en los tratamientos fertilizados se observó un patrón de bandas más diverso con respecto al control, mientras que en postcosecha las diferencias fueron menores. Otros trabajos obtuvieron resultados similares a los observados en presiembra, donde la fertilización con urea a largo plazo aumentó no sólo la intensidad de bandas con respecto al testigo sino que además incrementó el número de bandas o riqueza en el perfil DGGE (Shen *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010; Ai *et al.*, 2013). A su vez en presiembra se observa una separación específica a nivel de dosis, mientras que en postcosecha la misma no es evidente. Estas diferencias entre muestreos, podrían ser explicadas por la disponibilidad diferencial de N. En presiembra las condiciones de mayor mineralización de N determinadas por el rastrojo de soja estimularían cambios más evidentes en la composición de BOA; mientras que en postcosecha la presencia de rastrojo de maíz favoreció la inmovilización de N, lo cual está asociado al cese de la actividad microbiana (Ernst, 2002). A su vez, Wright *et al.* (2005) observaron una fuerte influencia de especies de plantas y residuos de cosecha sobre la diversidad microbiana del suelo. Si bien el diseño de los muestreos en el presente trabajo no permite asegurarlo, sería interesante determinar si estas diferencias se deben a los rastrojos presentes en superficie o a factores climáticos o estacionales, ya que ha sido demostrado en distintos ambientes que las BOA presentan un comportamiento estacional (Taylor *et al.*, 2012; Bouskill *et al.*, 2011).

Las poblaciones dominantes se afiliaron filogenéticamente al Grupo 3 de *Nitrosospira* comúnmente detectado en ambientes terrestres principalmente en suelos agrícolas (Kowalchuck & Stephen, 2001). La detección del género *Nitrosospira* y la ausencia de *Nitrosomonas* consistente con otras investigaciones (Kowalchuck *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010) que señalan la dominancia de *Nitrosospira* en suelos. Más allá de que algunos trabajos han encontrado que la aplicación de fertilizantes nitrogenados a largo plazo promueve la dominancia del Grupo 3 de *Nitrosospira* (He *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010), en este estudio las poblaciones afiliadas al Grupo 3 fueron detectadas también en el control sin aplicación de N. De acuerdo con lo observado por Chu *et al.* (2007) en tratamientos con y sin aplicación de urea a largo plazo, y por Avrahami *et al.* (2003) dicho grupo no necesariamente es dominante en condiciones de elevada concentración de amonio y fue

encontrado tanto en suelos fertilizados como en controles sin aplicación de N.

La elevada versatilidad de las BOA pertenecientes al Grupo 3 (Avrahami *et al.*, 2003) se ve reflejada en su ubicuidad en distintos tipos de suelos (Fierer *et al.* 2009 citado en Glaser *et al.*, 2010). La presencia de poblaciones con elevada similitud a clones de *Nitrosospira* no cultivables obtenidos de estanques mineros (Sow *et al.*, 2014), estaría relacionada con esta característica general de las BOA (Hiorns *et al.*, 1995; Kowalchuck & Stephen, 2001).

Nuestros resultados demuestran que el manejo de fertilización con urea a largo plazo en un suelo Argiudol típico de la Argentina no produjo efectos negativos sobre la comunidad de BOA, las que a su vez respondieron con cambios en la abundancia y estructura demostrando su sensibilidad al manejo agrícola.

CONCLUSIONES

La fertilización nitrogenada prolongada con urea aumentó el aporte de rastrojos y MOS, pero no generó cambios en la materia orgánica particulada. No obstante, a partir de la mineralización, el N de dicha fracción podría actuar como sustrato para los microorganismos nitrificantes del suelo. La disminución del pH edáfico, no afectó negativamente a la comunidad de nitrificantes. La urea representó una fuente de sustrato a partir del aporte de N, aumentando la abundancia y diversidad de las BOA. La actividad nitrificante potencial no reflejó estos cambios, sin embargo, el contenido de nitrato fue mayor en los tratamientos con aplicación. La estructura de la comunidad de BOA mostró cambios en respuesta a la fertilización y estuvo dominada por miembros del Grupo 3 de *Nitrosospira*.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados en este trabajo son parte de la Tesis de Maestría de la primera autora, en el Programa de Postgrado en Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. La primera autora desea expresar un profundo agradecimiento a la Dra. María Basanta y Ms. Laura Torres por el asesoramiento y colaboración en la redacción de este trabajo. Este estudio fue financiado por los Proyectos Específicos AEBIO 242441 (2010-2013) y PNS 1134043 de INTA. ELMF es miembro de la carrera de investigador científico de CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Ai, C; G Liang; J Sun; X Wang; P He & W Zhou. 2013. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil. *Soil Biol. & Bioch.* 57: 30-42.
- Alexander, M 1965. Most-probable number method for microbial populations. In: Black, CA (ed.). *Methods of soil analysis. Am. Soc. Agron.* Madison. Pp. 1467-1472.
- Avrahami, S; W Liesack & R Conrad. 2003. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environ. Microbiol.* 5: 691-705.
- Biederbeck, VO; CA Campbell; H Ukrainetz; D Curtin & OT Bouman. 1995. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with urea and anhydrous ammonia. *Can. J. Soil Sci.* 76: 7-14.
- Bremner, JM. 1965. Inorganic Forms of Nitrogen. In: Evans, DD; JL White; LE Ensminger & FE Clark (eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Am. Soc. of Agron.* Madison, USA. Pp. 1179-1232.
- Bouskill, NJ; D Eveillard; GO Mullan; GA Jackson & BB Ward. 2011. Seasonal and annual reoccurrence in Beta Proteobacterial ammonia-oxidizing bacterial population structure. *Environ. Microbiol.* 13(4): 872-886.
- Burton, SA & JL Prosser. 2001. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2952-2957.
- Cambardella, CA & ET Elliott. 1992. Particulate organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 777-783.
- Chantigny MH; DA Angers; T Morvan & C Pomar. 2004. Dynamics of pig slurry nitrogen in soil and plant as determined with N-15. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68: 637-643.
- Chien, SH; MM Gearhart & DJ Collamer. 2008. The Effect of Different Ammonical Nitrogen Sources on Soil Acidification. *Soil Sci.* 173(8): 544-551.
- Chu, H; T Fujii; S Morimoto; X Lin; K Yagi; J Hu & J Zhang. 2007. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 485-491.
- Ciarlo, EA & M Palma. 2011. Nitrógeno del suelo. En: Conti, ME & L Giuffré, (eds). *Edafología, bases y aplicaciones ambientales Argentinas.* 1ra edn. Editorial Facultad de Agronomía. Univ. Bs. As., Argentina. Pp. 363-384.
- Di Rienzo, JA; F Casanoves; MG Balzarini; L Gonzalez; M Tablada & CW Robledo InfoStat Versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Diovisalvi, NV; GA Studdert; GF Domínguez & MJ Eiza. 2008. Fracciones de carbono y nitrógeno orgánicos y nitrógeno anaeróbico bajo agricultura continua con dos sistemas de labranza. *Ci. Suelo* 26(1): 1-11.
- Divito, AG; HR Sainz Rozas; HE Echeverría; GA Studdert & N Wyngaard. 2011. Long term nitrogen fertilization: Soil property changes in an Argentine an Pampas soil under no tillage. *Soil Till. Res.* 114: 117-126.
- Drury, CF; SC Hart & XM Xang. 2008. Nitrification Techniques for Soil. In: Carter, MR & EG Gregorich (eds). *Soil sampling and methods of analysis.* 2da. edn. Canadian Society of soil Science, CRC Press, Taylor & Francis Group. New York, United States of America. Pp. 495-515.
- Echeverría, HE; NF San Martín & R Bergonzi. 2000. Métodos rápidos de estimación de nitrógeno potencialmente mineralizable en suelos. *Ci. Suelo* 18: 9-16.
- Enwall, K.; K Nyberg; S Bertilsson; H Cederlund; J Stenström & S Hallin. 2007. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biol. & Bioch.* 39: 106-115.
- Ernst, O; O Bentancur & R Borges. 2002. Descomposición de rastrojo de los cultivos en siembra directa sin laboreo: Trigo, Maíz, Soja y Trigo después de Maíz o de Soja. *Agrociencia* 6(1): 20-26.
- Fabrizzi, K; L Picone; A Berardo & F García. 1998. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en las propiedades químicas de un suelo Argiudol típico. *Ci. Suelo* 16: 71-76.
- Fabrizzi, KP; A Morón & F García. 2003. Soil C and N organic fractions in degraded vs. non-degraded Mollisols in Argentina. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67: 1831-1841.
- Fierer N; KM Carney; MC Horner-Devine & JP Megonigal. 2009. The biogeography of ammonia-oxidizing bacterial communities in soil. *Microbiol. Ecol.* 58: 435-445.
- Frioni, L. 2006. *Microbiología: Básica, ambiental y agrícola.* Publicaciones Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay, Montevideo, Uruguay. 464 pp.
- Galantini, JA; J Iglesias; M Landriscini; L Suárez & G Minoldo. 2008. Calidad y dinámica de las fracciones orgánicas en sistemas naturales y cultivados. En: Galantini, JA (ed). *Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina.* 1ra. Ed. Editorial UNS. Bahía Blanca, Bs. As., Argentina. Pp. 71-95.
- Gasparoni, JC. 2008. Determinación de la materia orgánica del suelo. En: Galantini, JA (ed). *Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina.* 1ra edn. Editorial UNS. Bahía Blanca, Bs. As., Argentina. Pp. 41-50.
- GelCompare II. 2005. Version 4.602 of Applied Maths NV.
- Gianello, C & JM Bremner. 1986. A simple chemical method of assessing potentially available organic nitrogen in soil. *Community Soil Sci. Plant. Anal.* 17: 195-214.
- Glaser, K; E Hackl; E Inselsbacher; J Strauss; W Wanek; S Zechmeister-Boltenstern & A Sessitsch. 2010. Dynamics of ammonia-oxidizing communities in barley-planted bulk soil and rhizosphere following nitrate and ammonium fertilizer amendment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74: 575-591.
- González, M; L Marbán & M Conti. 2011. Reacción del suelo. En: Conti, M & L Giuffré L. (eds). *Edafología, bases y aplicaciones ambientales Argentinas.* 1ra. edn. Editorial Facultad de Agronomía. Buenos Aires, Argentina. Pp. 297-312.
- Gregorutti, CV; LE Novelli; RJM Melchiori; MV Ormaechea & OP Caviglia. 2014. Nitrógeno incubado en anaerobiosis y su relación con el nitrógeno orgánico en diferentes fracciones. *Ci. Suelo* 32(1): 41-51.
- He, J.; J Shen; L Zhang; Y Zhu; Y Zheng; MXu & HJ Di. 2007. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ. Microbiol.* 9(9): 2364-2374.
- Hiorns, WD; RC Hastings; IM Head; AJ McCarthy; JR Saunders; RW Pickup & GH Hall. 1995. Amplification of 16s ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiol.* 141: 2793-2800.

- INTA, 1978. Carta de Suelos de la República Argentina. Hoja 3363-17. Marcos Juárez. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina. 86 pp.
- IRAM (Instituto de Normalización), 1999. Norma 29410. Determinación del pH.
- Keeney, DR. 1982. Nitrogen Availability Indices. In: Page, AL *et al.*, (eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Soil Sci. Soc. of Am.* Madison, Wisconsin, USA. Pp. 711-733.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molecular Evol.* 16: 111-120.
- Kowalchuk, GA & JR Stephen. 2001. Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 485-429.
- Kowalchuk, GA; JR Stephen; W De Boer; JI Prosser; TM Embley & JW Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the Beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1489-1497.
- Lavado, RS. 2010. La fertilidad, sus características y la utilización de fertilizantes. En: Álvarez, R; G Rubio; CR Álvarez & RS Lavado (eds). *Fertilidad de Suelos. Caracterización y Manejo en la Región Pampeana.* Ed. Facultad de Agronomía, UBA, Argentina. Pp. 1-8.
- Miller Blanco Gallego, J. 2012. Efecto de dos abonos verdes sobre la mineralización del nitrógeno y la dinámica de bacterias oxidantes del amoníaco y del nitrito en un ciclo de cultivo de maíz *Zea mays* L. Tesis de Maestría. UNC Palmira, Colombia. 145 pp.
- Muyzer, G; EC de Waal & AG Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nicol, GW; S Leininger; C Schleper & JI Prosser. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environ. Microbiol.* 10: 2966-2978.
- Nicolaisen, MH & NB Ramsing. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 50: 189-203.
- Nieder, R; DK Bendi & HW Scherer. 2010. Fixation and defixation of ammonium in soils: A Review. *Biol. Fertil. Soils* DOI 10.1007/s00374-010-0506-4.
- Orozco, F. 1999. La Biología del Nitrógeno, conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. Tomo I. Publicaciones Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 231 pp.
- Pommerening-Röser, A. & HP Koops. 2005. Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria. *Microbiol. Res.* 160: 27-35.
- Shen, J; L Zhang; Y Zhu; J Zhang & J He. 2008. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ. Microbiol.* 10(6): 1601-1611.
- Sow, SL; G Khoo; LK Chong; TJ Smith; PL Harrison & HK Ong. 2014. Molecular diversity of ammonia-oxidizing bacteria community in disused tin-mining ponds located within Kampar, Perak, Malaysia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 757-766.
- Tamura, K; G Stecher; D Peterson; A Filipski & S Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biol. & Evol.* 30: 2725-2729.
- Taylor, AE; LH Zeglin; TA Wanzek; DD Myrold & PJ Bottomley. 2012. Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations and contributions to soil nitrification potentials. *The ISME J.* 6: 2024-2032.
- Ward, BB. 2008. Nitrification. In: Jorgensen, SE & BD Fath (eds). *Ecological Processes.* Vol (3) Encyclopedia of Ecology. Princeton, NJ, USA. Pp. 2511-2518.
- Walkley, A & IA Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- Wright, AL; FM Hons & JE Matocha. 2005. Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Appl. Soil Ecol.* 29: 85-92.
- Wyngaard, N; HE Echeverría; HR Sainz Rozas & GA Divito. 2012. Fertilization and tillage effects on soil properties and maize yield in a Southern Pampas Arguidoll. *Soil & Till. Res.* 119: 22-30.
- Yu, W; Y Xu; M Bi; Q Ma & H Zhou. 2010. Activity and Composition of Ammonia-Oxidizing Bacteria in an Aquic Brown Soil as Influenced by Land Use and Fertilization. *Pedosphere* 20(6): 798-798.
- Zhang, B; B Sun; M Ji; H Liu & X Liu. 2010a. Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater. *Bioresour. Technol.* 101: 3054-3059.

