

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

Facultad de Ciencias de la Vida.

**"CARACTERIZACIÓN DE LAS RELACIONES
BIOGEOQUÍMICAS DEL SUELO Y SU INFLUENCIA
EN EL RECICLAJE DE CARBONO, NITROGENO Y
FÓSFORO EN DOS SISTEMAS DE ROTACIÓN
(MAÍZ-MAÍZ; MAÍZ FRIJOL) CON FERTILIZACIÓN
DIFERENCIADA"**

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de
Magister en Biociencias Aplicadas con mención en
Biodescubrimiento**

Presentado por: (Ronald Alfonso León Maridueña)

Guayaquil – Ecuador, 2023

AGRADECIMIENTO

El trabajo se desarrolló en la Granja Experimental Agroproductiva (GEA) de la ESPOL. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Suelos y Nutrición Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Vida (FCV) de la ESPOL, Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y en el departamento de Ciencias de los Cultivos de la Universidad de Illinois; por lo que agradezco a los directores de cada área como al personal técnico por el soporte brindado durante la investigación.

DEDICATORIA

A DIOS

A MI ESPOSA

A MI HIJO

A MIS PADRES

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Roberto Burbano, PhD

Presidente de Tribunal

Eduardo Álava H, PhD

Director de Tesis

Eduardo Chica M, PhD

Co-Director de tesis

Eduardo Chávez N, PhD

Evaluator

María Isabel Jiménez, PhD

Evaluator

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral".

RESUMEN

El uso de fertilizantes en conjunto con la rotación de cultivos puede impactar la biogeoquímica de suelos agrícolas. Tres dosis de fertilizantes (N+P kg ha⁻¹): baja (50+10), media (150+30), y alta (200+40) fueron aplicados durante tres años en maíz sin y con rotación con frijol de palo (*Cajanus cajan*). Las propiedades fisicoquímicas del suelo (pH, NH₄⁺, NO₃⁻, nitrógeno total-N, fósforo-P, carbono-C), actividad enzimática (β -glucosidasa-BG, N-acetyl- β -D-glucosaminidasa más Leucina aminopeptidasa-NAG+LAP y fosfato monoesterasa-FME) y la presencia/ausencia de bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito (BOA y BON, respectivamente) fueron estudiadas para evaluar el efecto continuo del N+P en las propiedades biogeoquímicas del suelo. La dosis alta provocó la mayor disminución del pH ($p < 0.05$) del suelo en ambos sistemas. La mayor concentración de P en suelo se observó en la dosis baja ($p < 0.05$). La concentración de NH₄⁺ y NO₃⁻ en monocultivo fue mayor que en la rotación ($p < 0.05$). Las concentraciones de N y C totales no fueron afectadas por el manejo de suelos (N+P*monocultivo – N+P*rotación). El C se relacionó ($p < 0.05$) con la concentración de BG y FME. El C, N y P no se relacionaron con ($p > 0.05$) las actividades NAG+LAP. En la rotación el pH se relacionó negativamente con las actividades NAG+LAP, BG y FME, mientras que, en el monocultivo lo hizo con la actividad BG. Después de tres años de evaluación la aplicación continua de N+P no afectó significativamente las variables evaluadas (a excepción del P) a pesar de realizar dos ciclos de maíz al año comparado a zonas de clima templado; mientras que, los sistemas tuvieron un mayor impacto en las enzimas y bacterias evaluadas. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que en suelos tropicales la aplicación de N+P en el tiempo impactan menos a los sistemas agrícolas. Además, que se evidenció que el monocultivo no presentó un efecto negativo en los ciclos de N, C y P.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	3
1.2	Objetivos específicos	3
2	MARCO TEORICO	4
2.1	Biogeoquímica en el ciclo de nutrientes	4
2.2	Los fertilizantes y su impacto en la biogeoquímica del suelo.....	9
2.3	La rotación de cultivos y sus beneficios en el suelo.....	11
2.4	El suelo y sus componentes de evaluación.	13
3	MATERIALES Y METODOS	15
3.1	Muestreo y preparación de muestras de suelo y tejido vegetal.	16
3.2	Análisis químicos.	17
3.3	Análisis microbiológico.	18
3.3.1	Extracción de ADN.	18
3.3.2	Amplificación por PCR-Primers.	18
3.3.3	Análisis por DGGE.	19
3.4	Análisis Enzimáticos.....	20
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Propiedades químicas del suelo.	22
4.2	Efecto del N+P sobre la actividad enzimática de la rotación y monocultivo.	27
4.3	Análisis temporal de la actividad enzimática y los contenidos C, N y P.	32
4.4	El pH del suelo y su efecto en la actividad enzimática del N, P y C.	35
4.5	Efecto de la aplicación de N+P en las bacterias oxidantes de amónico y nitrito. ..	36

4.6 Estructura de Unidades Taxonómicas Operacionales por dosis de fertilizantes aplicados.	39
4.7 Similitud de Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) de BOA y BON dentro de la rotación maíz-frijol y monocultivo.....	43
4.8 Análisis de correspondencia canónica por dosis de fertilizantes aplicados y siembra en monocultivo o rotación.....	46
5 DISCUSIÓN	50
5.1 El pH y su efecto en las variables biogeoquímicas del suelo.	50
5.2 N+P y su efecto en la biogeoquímica del suelo.	53
5.3 Monocultivo y Rotación maíz-frijol: efecto en la biogeoquímica del suelo.	58
5.4 Análisis temporal de la actividad enzimática y los contenidos C, N y P.	60
6 CONCLUSIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA.....	1

ABREVIATURAS

BG= β -glucosidasa.

BOA = Bacterias oxidantes de amoníaco.

BON= Bacterias oxidantes de nitrito.

FME= Fosfatomonoesterasa.

NAG+LAP= N-acetyl- β -D-glucosaminidasa + Leucina aminopeptidasa.

UTOs = Unidades Taxonómicas Operacionales.

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 3.1. Esquema de toma de muestras de suelo para análisis químico y biológico en monocultivo y rotación	17
Fig. 4.1. Dinámica de pH de suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.....	23
Fig. 4.2. Concentración del carbono (%) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.....	23
Fig. 4.3. Concentración del N (%) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.	24
Fig. 4.4. Concentración del NH_4^+ (mg/kg) en el suelo durante el segundo y tercer año de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.	25
Fig. 4.5. Concentración del NO_3^- (mg/kg) en el suelo durante el segundo y tercer año de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.	26
Fig. 4.6. Concentración de P (mg/kg) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.....	27
Fig. 4.7. Actividad β -1,4-N-acetilglucosaminidasa+leucina aminopeptidasa (NAG+LAP) (pNP g ⁻¹ suelo h ⁻¹) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistemas maíz-frijol y monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.....	28
Fig. 4.8. Actividad β -1,4 glucosidasa (BG) (pNP g ⁻¹ suelo h ⁻¹) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistema maíz-frijol y monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.	29

Fig. 4.9. Actividad Fosfomonoesterasa (FME) ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistemas maíz-frijol y monocultivo DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40) (B) actividad FME por rotación maíz-frijol y monocultivo. Barras representan la desviación estándar de tres replicas. 30

Fig. 4.10. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) de: A) β -1,4-N-acetylglucosaminidasa + Leucina aminopeptidasa (NAG+LAP) y β -1,4 glucosidasa (BG). B) NAG+LAP y Fosfomonoesterasa (FME). Círculos representan la relación de actividad enzimática por dosis combinadas N+P. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres réplicas de año dos y tres..... 31

Fig. 4.11. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) – Fosfomonoesterasa (FME). Círculos representan la relación de actividad enzimática por dosis combinadas N+P. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres réplicas de año dos y tres. 32

Fig. 4.12. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) (monocultivo maíz) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). 33

Fig. 4.13. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) (maíz-frijol) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). 33

Fig. 4.14. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) Fosfomonoesterasa (FME) (monocultivo maíz) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). 34

Fig. 4.15. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) Fosfomonoesterasa (FME) (maíz-frijol) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). 34

Fig. 4.16. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{ suelo h}^{-1}$) NAG = β -1,4-N-acetilglucosaminidasa+LAP = leucina aminopeptidasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). 35

Fig. 4.17. Relación entre actividad enzimática (pNP g ⁻¹ suelo h ⁻¹) BG = β-1,4 glucosidasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).	36
Fig. 4.18. Relación entre actividad enzimática (pNP g ⁻¹ suelo h ⁻¹) PME = fosfomonoesterasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).	36
Fig. 4.19. Diagramas de Venn muestran el número de UTOs únicos y semejantes entre las comunidades de bacterias que intervienen en el ciclo de nitrógeno. (A) y (B) UTOs de BOA (Bacterias oxidantes de amonio) de la rotación maíz-frijol y monocultivo, respectivamente. (C) y (D) UTOs de BON (Bacterias oxidantes de nitritos) de la rotación maíz-frijol y monocultivo, respectivamente. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).	38
Fig. 4.20. Análisis de la estructura de las BON (bacterias oxidantes de nitritos) por dosis combinadas N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).	39
Fig. 4.21. Análisis de la estructura de las BON (bacterias oxidantes de nitritos) por dosis combinadas N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).	40
Fig. 4.22. Análisis de la estructura de las BOA (bacterias oxidantes de amonio) por dosis combinadas N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).	40
Fig. 4.23 Análisis de la estructura de las BOA (Bacterias oxidantes de amonio) por dosis combinadas N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).	41
Fig. 4.24. Clasificación de las UTOs de las BOA (Bacterias oxidantes de amonio) según índice de Jaccard por combinación N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)	41
Fig. 4.25. Clasificación de las UTOs de las BOA (bacterias oxidantes de amonio) según índice de Jaccard por combinación N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)	42
Fig. 4.26. Clasificación de las UTOs de las BON (bacterias oxidantes de nitrito) según índice de Jaccard por combinación N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)	42

- Fig. 4.27.** Clasificación de las UTOs de las BON (Bacterias oxidantes de nitrito) según índice de Jaccard por combinación N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)..... 43
- Fig. 4.28.** Mapa de calor de Similaridad de Jaccard por dosis de fertilizantes para monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) está basado en la presencia y ausencia de los UTOs de bacterias oxidantes de nitrito. La presencia esta identificada por el color rojo y la ausencia por el azul. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)..... 44
- Fig. 4.29.** Mapa de calor de Similaridad de Jaccard por dosis de fertilizantes para monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) está basado en la presencia y ausencia de los OTUs de bacterias oxidantes de amoníaco. La presencia esta identificada por el color rojo y la ausencia por el azul. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)..... 44
- Fig. 4.30.** Escalamiento multidimensional no métrico por monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para el grupo de bacterias oxidantes de nitrito. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)..... 45
- Fig. 4.31.** Escalamiento multidimensional no métrico por monocultivo (M) y rotación y maíz-frijol (MF) para el grupo de bacterias oxidantes de amoníaco. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). 45
- Fig. 4.32.** Correspondencia canónica rotación maíz-frijol para las bacterias oxidantes de nitrito (BON) y bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) (Log). Eje 1:32.59% Eje 2:24.27%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40) 47
- Fig. 4.33.** Correspondencia canónica del monocultivo para las bacterias oxidantes de nitrito (BON) y bacterias oxidantes de amoníaco BOA (Log). Eje 1:23.36% Eje 2:18.5%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40) 48
- Fig. 4.34.** Correspondencia canónica por monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para las bacterias oxidantes de nitrito (A). Eje 1: 23,91% Eje 2: 20.38%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). 49
- Fig. 4.35.** Correspondencia canónica monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para las bacterias oxidantes de amoníaco Eje 1: 48.86% Eje 2: 21.07%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). 49

1 INTRODUCCIÓN

Los ciclos del nitrógeno (N) y fósforo (P) desempeñan un papel crucial en la regulación del ciclo del carbono (C) en los ecosistemas. Esto se debe a la interacción entre la mineralización y estabilización de la materia orgánica (MO), la cual está influenciada por la composición de los residuos orgánicos, la demanda microbiana y la actividad enzimática del suelo (Drinkwater et al., 2017; Y. P. Wang et al., 2007). Además, es importante tener en cuenta que el ciclo del nitrógeno también se ve afectado por las prácticas de manejo agrícola empleadas (Rütting et al., 2018) las cuales pueden tener consecuencias a largo plazo en el desarrollo de los cultivos. Estas prácticas pueden ocasionar modificaciones en las características biológicas y fisicoquímicas del suelo, como la disminución de la materia orgánica del suelo (MOS) (Pervaiz et al., 2020; Fiorini et al., 2020).

Para abordar estos desafíos, se han implementado técnicas de manejo agrícola que promueven la productividad de manera sostenible. Entre estas técnicas se destacan el uso razonable de fertilizantes sintéticos y la rotación de cultivos (Goyalfec et al., 2006; Osterholz et al., 2018). Estas prácticas tienen un impacto significativo en las comunidades biológicas y su actividad en el ciclo de nutrientes en el suelo (Bulluck et al., 2002; Marschner et al., 2003; Abán et al., 2021). Es importante tener en cuenta que el uso excesivo de nitrógeno (N) en los sistemas agrícolas ha sido identificado como uno de los principales factores que contribuyen a la pérdida de biodiversidad (X. Zhang et al., 2016)

Por otro lado, se sabe que la rotación de cultivos tiene un impacto en la mineralización del nitrógeno (N) en el suelo, lo que afecta su disponibilidad para el siguiente cultivo

(Osterholz et al., 2018). De hecho, se considera que la utilización de cereales en rotación con plantas fijadoras de N es óptima para promover el ciclo de nutrientes, mejorar la materia orgánica del suelo (MOS) y mantener la salud del suelo (Melero et al., 2011 ; Congreves et al., 2015; P. Zhang et al., 2019).

La mineralización y transformación de los nutrientes en el suelo están mediadas por la microbiota del suelo y sus enzimas extracelulares, que convierten los compuestos orgánicos e inorgánicos en formas disponibles para las plantas (Olander & Vitousek, 2000, Dotaniya et al., 2018). Estos procesos están relacionados con los ciclos biogeoquímicos del N, P y C (Jangid et al., 2008; Zungu et al., 2020). Entre la microbiota del suelo, los organismos oxidantes de amoníaco (NH_3) juegan un papel crucial en el proceso de nitrificación, el cual ocurre en dos etapas. En primer lugar, las bacterias y archaeas oxidantes de NH_3 (AOB y AOA, respectivamente) oxidan el NH_3 a nitrito (NO_2^-), y luego las bacterias oxidantes de NO_2^- (BON) oxidan el nitrito a nitrato (NO_3^-) (Freitag et al., 2005; Y. Wang et al., 2009; Attard et al., 2010; Carey et al., 2016; H. Xiao et al., 2021; Wertz et al., 2021).

La mineralización de N, P y C está estrechamente relacionada con las enzimas extracelulares presentes en el suelo (Štursová & Baldrian, 2011; Chen et al., 2018). Entre las enzimas extracelulares que desempeñan funciones específicas en los ciclos del N, C y P se encuentran la N-acetil- β -D-glucosaminidasa + Leucina aminopeptidasa (NAG+LAP), la β -1,4-glucosidasa (BG) y la Fosfomonoesterasa (FME) (Dotaniya et al., 2018; Ibarra et al., 2021). Las enzimas NAG+LAP descomponen proteínas y quitinas para adquirir N, mientras que la BG se encarga de la descomposición de la celulosa en azúcares, y la FME

hidroliza el P orgánico en formas inorgánicas disponibles (Jian et al., 2016; C. Wang et al., 2020; Zungu et al., 2020).

Varios estudios han evaluado el impacto del uso de fertilizantes químicos y la rotación de cultivos en las características químicas, biológicas y enzimáticas del suelo, especialmente en climas templados donde se cultiva un ciclo de maíz al año debido a las condiciones climáticas. Sin embargo, hay escasa información sobre el efecto de estas prácticas en la biogeoquímica relacionada directamente con los ciclos del N, P y C en suelos de clima tropical, donde se realizan dos ciclos de maíz al año. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto del uso de fertilizantes (N+P) en maíz, tanto en monocultivo como en rotación con leguminosas (*Cajanus cajan*), en las enzimas responsables de la adquisición de N, P y C, así como en las bacterias que dirigen el proceso de nitrificación. Se plantea la hipótesis de que el uso continuo de N+P, tanto en monocultivo como en rotación, alterará los contenidos de C, N y P en el suelo, así como generará cambios en la actividad de las enzimas y los microorganismos involucrados en los ciclos del N, P y C.

1.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de tres dosis de fertilizantes (N+P) en la biogeoquímica del carbono, nitrógeno y fósforo en suelos tropicales en monocultivo (maíz) y rotación maíz-frijol.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar parámetros químicos de suelo tales como: pH, nitrógeno total, NH_4^+ , NO_3^- y fósforo.
- Determinar la presencia y ausencia de las bacterias involucradas en el proceso de nitrificación.
- Determinar la actividad de enzimas que catalizan los procesos de reciclaje de carbono, nitrógeno y fósforo en el suelo.

2 MARCO TEORICO

2.1 Biogeoquímica en el ciclo de nutrientes

En los ciclos biológicos, el suelo desempeña un papel crucial en la transformación de la materia a través de procesos físicos, químicos y biológicos. Elementos como el carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) juegan un papel fundamental, especialmente en áreas agrícolas, ya que son utilizados por las plantas para su crecimiento (Kudeyarov, 2019). Los ciclos del C, N y P están estrechamente interrelacionados (Mackenzie et al., 2002; Berhe et al., 2018) ya que forman la base de los ciclos biogeoquímicos en la tierra (Chen et al., 2015). Sin embargo, las actividades humanas, como la agricultura, también pueden alterar estos ciclos y producir cambios temporales en los suelos (Subbarao et al., 2015) como la disminución de los contenidos de C, N y otros elementos (Amundson, 2022). Por lo tanto, es de suma importancia estudiar cómo se reciclan estos nutrientes en el suelo.

El ciclo del N es uno de los más importantes en los ecosistemas terrestres (Hayatsu et al., 2008). Este ciclo es impulsado por procesos de fijación de N, nitrificación y desnitrificación, en los cuales intervienen diversos microorganismos especializados (Persson et al., 2000; Hayatsu et al., 2008; Subbarao et al., 2015; Stein & Klotz, 2016). Estos microorganismos transforman el gas dinitrógeno en amoníaco (NH_3) ya que el dinitrógeno no es fácilmente asimilable para las plantas debido a su estabilidad química (Socolow, 1999; Zaehle et al., 2010). El N también se encuentra enlazado al carbono a través de compuestos orgánicos, como proteínas y aminoácidos (Socolow, 1999), y los microorganismos son responsables de convertirlo en formas asimilables mediante la

mineralización (Nannipieri & Eldor, 2009; Attard et al., 2010; Ollivier et al., 2011; Singh et al., 2021).

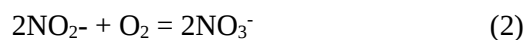
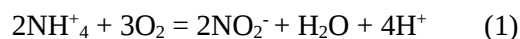
Diversos factores afectan la nitrificación, entre ellos la disponibilidad de amonio (NH_4^+) para las bacterias (Sahrawat, 2008; Robertson & Groffman, 2007). El NH_4^+ en el suelo puede ser escaso debido a la inmovilización biológica o la fijación del nitrógeno orgánico y/o la adsorción de iones NH_4^+ a las arcillas minerales (Sahrawat, 2008). El oxígeno también desempeña un papel importante en el proceso de nitrificación, ya que los microorganismos nitrificantes son aeróbicos (Robertson & Groffman, 2007). Se ha observado que la mayor tasa de nitrificación ocurre cuando el oxígeno representa alrededor del 20% del aire total presente en el suelo, y su interacción con la humedad del suelo también es relevante, ya que ambos factores contribuyen a la formación de nitrato (NO_3^-) (Sahrawat, 2008). Por lo tanto, la nitrificación se ve favorecida en suelos bien drenados (Barnard et al., 2005) y se reduce en suelos secos (Barnard et al., 2005; Heil et al., 2016). Además, aunque la nitrificación puede ocurrir en diferentes rangos de temperatura, se ha demostrado que los rangos entre 30-35°C optimizan este proceso (Robertson & Groffman, 2007; Sahrawat, 2008). Por otro lado, el contenido elevado de arcilla en el suelo mejora la mineralización y la nitrificación en comparación con suelos con bajo contenido de arcilla. Sin embargo, en suelos con exceso de humedad, las arcillas protegen el N orgánico de la descomposición bacteriana (Sahrawat, 2008).

El pH del suelo también puede afectar el proceso de nitrificación. Se estima que los suelos con un rango de pH entre 5.5 y 10 favorecen la nitrificación, y se obtiene la mayor tasa de nitrificación a un valor de pH de 8.5 (Sahrawat, 2008). Autores como Heil et al., (2016) y Robertson & Groffman, (2007) indican que el pH óptimo para la nitrificación

está entre 7-9 y 7.5-8, respectivamente. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la nitrificación también puede ocurrir en valores de pH tan bajos como 3 (Y. Li et al., 2018; Sahrawat, 2008). No obstante, la nitrificación puede disminuir en suelos ácidos debido a la ionización del NH_3 por iones de hidrógeno, ya que el NH_3 es el principal ion para los organismos que oxidan el amoníaco (Hu & He, 2017). Por otro lado, las bacterias oxidantes de amonio (BOA) y las bacterias oxidantes de nitrito (BON), que median estas reacciones, por lo general son suprimidas en pH alcalinos, y las BON son más susceptibles que las BOA (Heil et al., 2016).

Dentro de estos organismos, los oxidantes de amonio desempeñan un papel importante en el proceso de nitrificación, que ocurre en dos etapas. En primer lugar, las bacterias y archaeas oxidantes de amonio oxidan el NH_3 a NO_2^- , y luego las bacterias oxidantes de NO_2^- lo oxidan a NO_3^- (Freitag et al., 2005; Y. Wang et al., 2009; Attard et al., 2010; Subbarao et al., 2015; Carey et al., 2016; Z. Li et al., 2020; H. Xiao et al., 2021; Wertz et al., 2021; Martikainen, 2022).

Estas bacterias son gramnegativas, aeróbicas y quimioautótrofas (Verstraete & Focht, 1977; Heil et al., 2016), y los análisis moleculares revelan que las BOA pertenecen a la clase Proteobacterias, con los géneros *Nitrosococcus spp.*, *Nitrospira spp.* y *Nitrosomonas spp.*, mientras que las BON pertenecen a las clases Alphaproteobacterias y Proteobacterias, con los géneros *Nitrobacter spp.* y *Nitrospira spp.*, respectivamente (Oved et al., 2001; Freitag et al., 2005; Y. Wang et al., 2009; Attard et al., 2010; Han et al., 2018). Las bacterias más relevantes en el proceso de nitrificación son *Nitrosomonas spp.* (1) y *Nitrobacter spp.* (2), cuyas enzimas catalizan las siguientes reacciones (Sahrawat, 2008):



Por lo general, la abundancia de las bacterias oxidantes de amonio (*Nitrosomonas spp.*) en el suelo es menor que la de las bacterias oxidantes de nitrito (*Nitrobacter spp.*), y esta diferencia disminuye a medida que aumenta la profundidad del suelo (Verstraete & Focht, 1977). Sin embargo, las BOA y las BON coexisten y se benefician mutuamente (Peng & Zhu, 2006; Beeckman et al., 2018). Las BON son capaces de interceptar el NO_2^- producido por las BOA, mientras que las BON liberan a las BOA del efecto tóxico del NO_2^- (Peng & Zhu, 2006).

Las investigaciones concluyen que el comportamiento de este grupo de organismos está influenciado tanto por los cambios climáticos como por las actividades antropogénicas, como el uso de fertilizantes. La producción de alimentos es la actividad que tiene un mayor impacto en el ciclo del N en la tierra debido a la adición de fertilizantes nitrogenados (Carey et al., 2016; Ollivier et al., 2011; Ouyang & Norton, 2020; Wertz et al., 2021). En efecto, se ha identificado que las Proteobacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrospira* se encuentran en menor cantidad en suelos no perturbados (Bruns et al., 1999).

Por ejemplo, Ouyang & Norton, (2020) determinaron que la composición de las bacterias oxidantes de amonio (BOA) experimentó cambios después de 4 años de aplicar fertilizantes amoniacales, en comparación con el abono orgánico que no provocó modificaciones significativas. Por otro lado, Sarathchandra et al., (2001) encontraron que la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfatados no afecta la población total de bacterias presentes en el suelo.

El pH del suelo también puede influir en este grupo de microorganismos. Algunas archaeas oxidantes de amonio (AOA) crecen exclusivamente en ambientes ácidos con un pH de 4-5.5, mientras que otras lo hacen en un pH neutro, al igual que las BOA. Además, se ha encontrado evidencia de que las BOA pueden crecer en ambientes ácidos. Por lo tanto, la cantidad, duración y acumulación de los fertilizantes son factores que pueden modificar a las bacterias y archaeas oxidantes de amonio en el suelo (Carey et al., 2016).

Al igual que el nitrógeno, la disponibilidad de fósforo en el suelo depende de la actividad biológica, las características físicas-químicas y la especie cultivada (Dos Santos et al., 2008). El fósforo en el suelo puede estar fácilmente disponible para las plantas (<5% del fósforo total) o asociado a fracciones minerales o constituyentes orgánicos que no son fácilmente disponibles (Hou et al., 2018; Hallama et al., 2018). La absorción de fósforo por parte de las plantas está regulada por procesos de desorción o disolución del fósforo inorgánico en la fase sólida (Zheng et al., 2002). Los microorganismos y las plantas participan en la mineralización del fósforo orgánico al absorberlo y sintetizar nuevo fósforo orgánico, al mismo tiempo que influyen en la solubilidad del fósforo mineral mediante la liberación de exudados (Helfenstein et al., 2018). Por lo tanto, el ciclo del fósforo está influenciado por la inmovilización, mineralización y redistribución del fósforo, controlado por propiedades fisicoquímicas, microorganismos (Cross & Schlesinger, 1995; Plante, 2006) y la actividad de la enzima fosfatasa (Acosta-Martínez & Tabatabai, 2015). Esta enzima es producida por alrededor del 70-80% de los microorganismos del suelo, como las bacterias de los géneros *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pantoea spp.*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Streptomyces spp.*, y hongos como

Aspergillus spp., *Penicilium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Cunninghamella spp.*, además de las micorrizas arbusculares, que se encuentran entre los principales organismos solubilizadores de fósforo en el suelo (Plante, 2006; Hallama et al., 2018).

Finalmente, el carbono orgánico del suelo (COS), que se encuentra dentro de la materia orgánica del suelo (MOS), es uno de los reservorios de carbono que influyen en el ciclo del carbono en la naturaleza (Janzen, 2004; Lal, 2004; da Silva et al., 2008). El COS está compuesto principalmente por humus, que es el producto de la descomposición de residuos de plantas y animales (Lal, 2004), en la cual participan diversos grupos de microorganismos (Gougoulas et al., 2014). Por lo tanto, el ciclo del carbono es el resultado del intercambio de carbono dentro y entre los diferentes reservorios de carbono, en el cual los procesos físicos, químicos y biológicos desempeñan un papel fundamental (Ussiri & Lal, 2017)

2.2 Los fertilizantes y su impacto en la biogeoquímica del suelo.

En sistemas agrícolas, la producción es afectada por los componentes físicos, químicos y biológicos del suelo. El uso de fertilizantes, ya sean orgánicos o químicos, tiene como objetivo incrementar los nutrientes disponibles para las plantas y mejorar la producción (Bulluck et al., 2002; Marschner et al., 2003). La materia orgánica juega un papel fundamental en la disponibilidad de elementos, la cual puede provenir de estiércol animal, residuos vegetales o del aumento en la biomasa de los cultivos (Marschner et al., 2003). Estudios comparativos basados en nutrición química versus orgánica han encontrado que macronutrientes como calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) aumentan su concentración en el suelo hasta tres veces en sistemas fertilizados con productos orgánicos. Además, los micronutrientes como el manganeso (Mn) y boro (B)

también se ven beneficiados. El contenido de materia orgánica (MO), carbono total (Ct) y capacidad de intercambio catiónico (CIC) también es mayor en comparación con la fertilización convencional. A su vez, el pH del suelo inicialmente es menor, pero aumenta al segundo año de aplicación en comparación con la fertilización convencional (Bulluck et al., 2002).

Se ha demostrado que la adición de nitrógeno (N) afecta significativamente la estructura de los microbiomas en los ecosistemas (Ullah et al., 2019). Investigaciones han determinado que la aplicación de N sintético en periodos sucesivos aumenta la población microbiana en el suelo en un 15.1% en comparación con los no fertilizados (Y. Zhang et al., 2019). Leff et al., (2015) encontraron que la aplicación de N y P aumentó la abundancia relativa de familias como *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, disminuyendo familias como *Acidobacteria*, *Planctomycetes* y *Deltaproteobacteria*. De manera similar, Bulluck et al., (2002) mencionan que los sistemas de producción agrícola basados en enmiendas orgánicas aumentan la presencia de poblaciones de microorganismos termofílicos, bacterias entéricas y hongos benéficos como *Trichoderma*, mientras que disminuyen hongos patógenos como *Phytophthora* y *Pythium* en comparación con sistemas basados en fertilización química. Sin embargo, también se han reportado resultados opuestos, como el decremento en la biomasa microbiana debido a la reducción del pH del suelo (Zhu et al., 2015; Y. Zhang et al., 2019). E. Xiao et al., (2021), corroboraron que el pH producto de la aplicación de fertilizantes afecta la diversidad bacteriana, mejorando su índice de riqueza conforme sus valores se incrementan. Esto se debe a que muchos grupos bacterianos son sensibles al crecer en rangos de pH específicos, y también se cree que la diversidad microbiana en el suelo es influenciada por el contenido de P, altitud y relación de cationes del suelo

como el Ca_2^+ , Mg_2^+ y Al_3^+ (Chaparro et al., 2012). De hecho, se ha encontrado que, reduciendo el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos, los microorganismos contribuyen a mantener la productividad de las plantas gracias a la mineralización del N (Lagomarsino et al., 2009; Preissel et al., 2015). Marschner et al., (2003) también determinaron que la actividad enzimática del suelo es modificada tanto por el uso de materia orgánica como por la aplicación de NPK sintéticos a largo plazo.

2.3 La rotación de cultivos y sus beneficios en el suelo.

La rotación de cultivos se define como la siembra temporal y en secuencia de diferentes cultivos en una misma área (Lal, 2003; Wander, 2004; Castellazzi et al., 2008). Entre las principales ventajas de la rotación de cultivos se encuentra la mejora de la calidad y optimización del uso del suelo, lo que conlleva a aumentar los beneficios económicos, agrícolas o medioambientales, en comparación con sistemas dependientes de fertilizantes químicos (Lal, 2003; Wander, 2004; Castellazzi et al., 2008; Tang et al., 2017; Fan et al., 2020). Según Preissel et al., (2015) los efectos de la rotación de cultivos deben ser evaluados de forma holística por un largo periodo de tiempo. Por ejemplo, se ha determinado que la fertilidad de los suelos mejora en comparación a los monocultivos, ya que los nutrientes aplicados en un cultivo pueden ser reciclados por el siguiente (Abán et al., 2021; Maccari et al., 2021)

La rotación de cultivos también afecta el reciclaje de nutrientes, que a su vez es controlado por los microorganismos del suelo y su actividad enzimática (Gałązka et al., 2017). Ma et al., (2016); Uzoh et al., (2019) y Melero et al., (2011), concuerdan que esta práctica influye positivamente en las propiedades físicas-químicas y biológicas del suelo. Esto puede deberse a que el intercalar cultivos, comúnmente gramíneas con leguminosas, se produce una mayor biomasa que los sistemas basados en monocultivos

(Isbell et al., 2017). Los residuos vegetales de leguminosas contribuirán con N al suelo producto de la mineralización realizada por microorganismos (Uzoh et al., 2019).

En China, se ha determinado que los sistemas de rotación maíz-soya incrementan la actividad de las enzimas proteasas, ureasa y nitrato reductasa en el suelo en comparación con los monocultivos. Además, se encuentran en mayor proporción proteobacterias, acidobacterias, chloroflexi y actinobacterias (FU et al., 2019). Pittarello et al., (2021) determinaron que al rotar cultivos con fabáceas se incrementa la β -glucosidasa y la fijación de P por medio de la actividad fosfatasa.

Se ha documentado el aumento de la producción en los cereales después de un ciclo con leguminosas como el beneficio de mayor impacto, contrario a la siembra continua (maíz-maíz o soya-soya) (Farmaha et al., 2016; Reckling et al., 2016). Según el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), los mayores aumentos en áreas de maíz al este y sureste de África se dieron después de la siembra de frijol, caupí o soya (FAO, 2019).. Estudios realizados en la zona del medio oeste de Estados Unidos encontraron que los rendimientos de maíz y soya disminuyeron en un 4.3% y 10.3%, respectivamente, al realizarse de manera consecutiva, mientras que al rotar los cultivos, la producción de maíz aumentó en promedio un 7.8% (Seifert et al., 2017; Vuyyuru et al., 2020). En zonas con sistemas de irrigación, se han reportado incrementos entre 11.5 a 14 Mg ha⁻¹ después de 9 años de ciclos consecutivos (Farmaha et al., 2016). Sin embargo, en Europa, la siembra de esta especie disminuyó de 5.8 Mg ha en 1961 a 1.8 Mg ha en 2013 debido a factores como el desarrollo de cereales más productivos, bajos rendimientos, menores márgenes de ganancia y principalmente por la inhabilidad de reconocer los beneficios a largo plazo de las leguminosas dentro de los sistemas de rotación (Reckling et al., 2016).

2.4 El suelo y sus componentes de evaluación.

En los ecosistemas agrícolas, los ciclos del C, N y P son de gran relevancia debido a su impacto tanto en el rendimiento de los cultivos como en la calidad del suelo (L. Wang et al., 2019; C. Wang et al., 2020). Estos ciclos están influenciados por diversos factores físicos, químicos y biológicos que interactúan dentro del sistema agrícola y afectan la salud y calidad del suelo (Moebius-Clune et al., 2016; Kučerík et al., 2018). El papel fundamental de los componentes bióticos, especialmente los microorganismos, es esencial para regular el ciclo de nutrientes mediante la descomposición de material vegetal y, en última instancia, afectar la fertilidad del suelo (Anderson, 2003).

La calidad del suelo se define como la capacidad continua del suelo para funcionar como un sistema vivo dentro de los límites del ecosistema y el uso de la tierra, manteniendo la productividad biológica, la calidad del aire y del agua, así como la salud de las plantas, animales y seres humanos (Doran & Safley, 1997). Esta calidad está determinada por procesos biológicos, ciclos de conservación y degradación, y diversas interacciones entre el ecosistema del suelo, la vegetación, factores ambientales y las actividades humanas, como fertilización, irrigación, labranza y rotación de cultivos (Marinari et al., 2000; Nielsen & Winding, 2002; Kong et al., 2011; Nivelle et al., 2016; T. Liu et al., 2020).

La capacidad del suelo para retener y liberar nutrientes es esencial para proporcionar un ambiente adecuado para el crecimiento de las raíces de las plantas y facilitar el intercambio de gases entre el agua y el suelo. La calidad del suelo se aborda a través de sus componentes físicos, químicos y biológicos (Lal, 2003).. Aunque definir parámetros específicos para clasificar la calidad del suelo puede ser complejo debido a la diversidad

de suelos y agroecosistemas (Reeves, 1997; Schlöter et al., 2003), se ha reconocido que factores como la textura, densidad e infiltración, capacidad de retención de agua, porosidad, estabilidad de los agregados del suelo, profundidad, contenido de carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO), pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y disponibilidad de nutrientes como N, P, K y S, así como la cantidad, actividad y diversidad de la fauna y flora y las enzimas del suelo son importantes indicadores a considerar (Sharma et al., 2011). Esta amplia gama de factores y su compleja interacción hacen que el estudio y comprensión de la calidad del suelo sea un desafío importante para los investigadores y agricultores. Sin embargo, es esencial seguir investigando y evaluando estos parámetros para implementar prácticas agrícolas sostenibles que promuevan una adecuada salud y calidad del suelo, así como una producción agrícola sustentable y respetuosa con el medio ambiente.

3 MATERIALES Y METODOS

El estudio fue llevado a cabo en un cultivo de maíz (con y sin rotación, ver más adelante) establecido en enero del 2019 en la “Granja Experimental Agroproductiva” (GEA) localizada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) en la ciudad de Guayaquil, provincia del Guayas-Ecuador (2.14756° S, 79.95837°W). Según la clasificación de zonas de vida de Holdridge, esta zona corresponde a Bosque Seco Tropical (Serrano & Calderón, 2016) con suelo clasificado como Vertisol. La precipitación promedio al año fue de entre 650 a 669 mm con una temperatura media de 25°C (INOCAR, 2022; estación meteorológica 001D0AF19605). Se evaluó el efecto de tres dosis de fertilizantes (N+P) en un monocultivo de maíz y rotación de maíz-frijol sobre los ciclos del C, N y P a través de aspectos biogeoquímicos de suelo. La parte química fue evaluada desde el año 1 (a excepción de amonio y nitrato, que se evaluaron en el año dos y tres) y la enzimática fue realizada al segundo y tercer año; mientras que la parte microbiológica (*Nitrosomonas spp.* y *Nitrobacter spp.*) solo al año 2 del estudio.

Las dosis de fertilizantes aplicados fueron 50+10, 150+30 y 200+40 kg (de N+P) ha⁻¹ (de aquí en adelante: dosis baja, dosis media y dosis alta, respectivamente). Todos los tratamientos recibieron 40 kg ha⁻¹ K. En una parte de la parcela, el maíz se sembró continuamente en dos ciclos por año (maíz-maíz), mientras que en la otra parte se sembró en rotación maíz-fríjol con un ciclo de maíz por año. Los tratamientos fueron sembrados en bloques de 120 m². En la rotación, el maíz fue sembrado en la época lluviosa (enero a mayo) y el fríjol en época seca (junio a diciembre). Al final del crecimiento vegetativo de frijol, la parte aérea fue cortada y dejada en el suelo como abono verde. Los fertilizantes

fueron aplicados solo en el maíz, una y dos veces al año para la rotación y siembra continua, respectivamente, a los 15, 30 y 40 días del desarrollo vegetativo de la planta.

Las fuentes de N y P usadas fueron urea y fosfato diamónico (DAP), respectivamente. Los materiales vegetales correspondieron al híbrido ADVANTA 9139 para el maíz (*Zea mays L.*) mientras que la semilla de leguminosa (*Cajanus cajan*) fue obtenida de agricultores locales.

3.1 Muestreo y preparación de muestras de suelo y tejido vegetal.

El suelo fue recolectado una vez al año durante la época seca (noviembre 2020, 2021 y 2022) al culminar el ciclo el segundo ciclo de maíz. Las muestras fueron tomadas entre plantas de 0-30 cm de profundidad. Para el muestreo, se tomó como referencia la madurez fisiológica (R6) de las plantas de maíz, según esquema de la Fig.3.1. Se tomaron tres submuestras por cada tratamiento, las mismas que fueron homogenizadas para obtener una muestra compuesta de 1 kg. Los suelos fueron etiquetados, homogeneizados y divididos en tres para los análisis. Las muestras para los análisis químicos y enzimáticos fueron trasladadas a los Laboratorios de Suelos y Nutrición Vegetal de la ESPOL y Ciencias del Suelo de la Universidad de Illinois (USA), respectivamente. Una parte de las muestras fue congelada y almacenada a -20°C para su análisis microbiológico desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca. Para los análisis químicos y enzimáticos, el suelo fue secado por 72 h a temperatura ambiente bajo invernadero y posteriormente pasado por un tamiz de 2 mm y almacenado hasta su análisis.

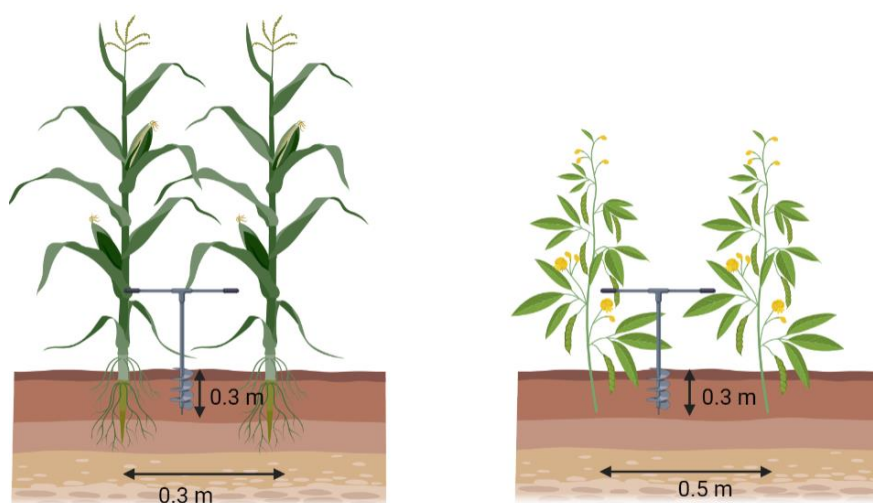


Fig. 3.1. Esquema de toma de muestras de suelo para análisis químico y biológico en monocultivo y rotación

3.2 Análisis químicos.

Se analizaron las concentraciones de C, N y P presentes en el suelo. El N y C total fue obtenido por combustión de 125 mg de suelo en un analizador elemental (vario MACRO cube, Elementar). Las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- fueron determinados por colorimetría usando 2 M KCl como agente de extracción. Seis gramos de suelo fueron colocados en tubos falcon de 50 mL y extraídos con 30 mL de KCl (1:5 m/v). Los tubos fueron agitados horizontalmente a 150 rev/min^{-1} por 1 h; posteriormente se centrifugaron por 30 s a 4150 g min^{-1} . Las concentraciones fueron cuantificadas usando el método de silicato para NH_4^+ (Verdouw et al., 1978) y reducción por cloruro de vanadio (III) para el NO_3^- (Doane & Horwáth, 2003).

Para el P; 5 g de suelo fue extraído por acetato de amonio 1 M y analizado por Espectrometría de Emisión Óptica (ICP-OES, PerkinElmer, Modelo Optima 5300 DV). El pH fue medido mediante un medidor portátil (APERA Serie 400S) en extracto en agua destilada en relación 1:5 (p/v).

3.3 Análisis microbiológico.

3.3.1 Extracción de ADN.

El ADN total del suelo fue extraído de 250 mg de muestra a través del DNeasy PowerSoil Pro-Kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -20°C

3.3.2 Amplificación por PCR-Primers.

Para el género *Nitrobacter* spp. se utilizaron los pares de primers específicos nxrB-1F (ACG TGG AGA CCA AGC CGG G) y nxrB-1R (CCG TGC TGT TGA YCT CGT TGA) (S. Liu et al., 2022). Para *Nitrosomonas* spp. se usaron los primers AmoA-1F (GGG GTT TCT ACT GGT GGT) y AmoA-2R-TC (CCC CTC TGG AAA GCC TTC TTC) (Nicolaisen & Ramsing, 2002). En ambos grupos de bacterias se añadieron grapas GC al final de las terminaciones 5' de los primers forwards para llevar a cabo una segunda amplificación y posterior evaluación por DGGE (*Nitrobacter* spp.: CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G; *Nitrosomonas* spp.: CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GC).

La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf y fue llevada a cabo usando GOTaq® G2 Hot Start Colorless Master Mix. Se utilizaron soluciones de 25µL a 0,4 µM y 3 µM para las especies *Nitrobacter* y *Nitrosomonas* respectivamente. La solución estuvo constituida por 12,5 µL de GOTaq® Hot Start Colorless Master Mix, 2,5 µL de cada primer, 5 µL de la plantilla de ADN de suelo y 2,5 µL de H₂O.

Para *Nitrobacter* spp. el perfil térmico utilizado fue el descrito por Shuang Liu et al., (2022) con las siguientes condiciones: 5 min a 95°C para una desnaturalización inicial,

10 ciclos a 95°C por 30 s para desnaturalizar, 60°C por 30 s para alineamiento y 60 s a 72°C para extensión, seguido por 25 ciclos a 95°C por 30 s para desnaturalizar, 55°C por 30 s para alineamiento y 60 s a 72°C para extensión y 10 min finales para extensión. Para *Nitrosomonas spp.* el perfil térmico usado fue el desarrollado por (Nicolaisen & Ramsing, 2002) como sigue a continuación: 92°C por un min 35 ciclos de 92°C por 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 45 s más 1s/ciclo. El último ciclo tuvo 5 min para la extensión final. Para la amplificación con la grapa GC una segunda PCR con 18 ciclos fue realizada con las condiciones similares descritas arriba.

3.3.3 Análisis por DGGE.

Los fragmentos amplificados fueron separados por DGGE en función de la secuencia de nucleótidos. El análisis fue llevado a cabo por medio de un DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). Las muestras producto de la PCR para las especies *Nitrobacter* y *Nitrosomonas* fueron cargados en gel de poliacrilamida del 6 y 8%, respectivamente. Los gradientes desnaturalizantes fueron de 60 a 75% y 30 a 70%, respectivamente. La solución desnaturalizante fue 7 M de urea y 40% de formamida. La electroforesis para *Nitrobacter spp.* fue llevada a cabo a 56°C a 69 V por 17 h. Para *Nitrosomonas spp.* fue por 15 h a 100 V a 60°C según protocolos establecidos por Shuang Liu et al., (2022) y Nicolaisen & Ramsing, (2002), respectivamente. Para ambos grupos de bacterias se cargaron 10 µl de ADN amplificado mezclado con 2 µl de buffer de carga (Bluejuice 10X) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Después de la corrida electroforética las muestras fueron teñidas con SYBR GREEN 2X durante 20 min a temperatura ambiente y bajo oscuridad. Posteriormente las imágenes se visualizaron y foto-documentaron con un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™XR+ Imaging System para su posterior análisis.

3.4 Análisis Enzimáticos.

La actividad enzimática de suelos fue determinada usando la metodología establecida por Tabatabai & Bremner, (1969) y modificada por Tabatabai, (1994), Margenot et al., (2018) y Daughtridge et al., (2021). Un gramo de suelo ($\pm 0,02$) fueron colocados en tubos de centrifuga de 50 ml. Agua $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$ fue utilizada como matriz de reacción de acuerdo con lo reportado por Li et al., (2021) y Wade et al., (2021) quienes mencionan que el usar un buffer universal modificado (BUM) no necesariamente mantiene un pH óptimo durante la reacción enzimática como tampoco garantiza la más alta actividad. Los sustratos específicos pNP- β -D-Glucopiranosidasa, pNP-Sal disódica de fosfato hexahidratado y pNP-N-acetil- β -D-Glucosaminida fueron utilizados para la preparación de solución (sustrato) de extracción para las enzimas β -glucosidasa (β G), Fosfomonoestearasa (FME) y Quitinasa (NGA) respectivamente. Para las enzimas β G y NGA, se utilizó 5 mL de solución de sustrato pNP 10 mM mientras que 20 mM fue usado para la enzima FME. Los tubos fueron agitados durante un min y puestos a incubación a 37°C de temperatura durante 1 h produciendo concentraciones cuantificables de pNP. Posteriormente; la reacción fue terminada con 1 mL de 2M CaCl_2 para flocular el sedimento y 4 mL de TRIS (tris (hidroximetil) aminometano) (0,1 M; pH12) para alcalinizar la solución para colorimetría. 1 mL de cada tubo fue extraído y colocado en tubos de microcentrífuga para clarificar el sobrenadante por centrifugación a 1400 rpm por 1 min y 45 s. Finalmente; 200 μL por cada muestra fue cuantificada a una absorbancia a 410 nm por espectrofotometría. Los estándares fueron preparados con solución pNP (4-nitrofenol) 5 mM en concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 20x. Los

blancos usados fueron agua $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$ sin suelo y sustrato y solución de pNP; los mismos fueron tratados igual que las muestras.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se utilizó un Análisis factorial para evaluar el efecto de los tratamientos (aplicación de nutrientes en monocultivo o rotación) sobre el C, N, P y enzimas de suelo mediante el programa JMP Pro 17. La riqueza de especies (S) (definida como el número de diferentes organismos presentes en una muestra, no tomando en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad) por tratamiento y rotación se obtuvo del perfil de imágenes producto del DGGE (número de bandas presentes) mediante el programa bioinformático Gel Analyzer. Para evaluar la estructura de las comunidades de las unidades taxonómicas operacionales (UTOs) de las BOA y BON se utilizó los análisis multivariados: escalamiento no métrico multidimensional (NMDS) y análisis de similitudes (ANOSIM) de una y dos vías basado en el índice de similaridad de Jaccard que mide datos de presencia y/o ausencia de las especies proporcionándoles pesos iguales de importancia (Real, 1999; Podani, 2021). El NMDS es un método de agrupamiento empleado para distribuir tratamientos evaluados en un sistema de coordenadas de dos dimensiones logrando que las diferencias en similitud se mantengan. ANOSIM es una prueba no paramétrica que calcula el estadístico R de disimilitud entre grupos que va de 1 a 0, donde 1 es menos similitud y cero es mayor similitud, estableciendo las diferencias estadísticas de una comunidad usando análisis de conglomerados (Giraldo Mendoza, 2015).

Adicionalmente se realizó un análisis de correspondencia canónica para evaluar si existe relación entre las variables químicas con las enzimas relacionadas al C, N y P.

4 RESULTADOS

4.1 Propiedades químicas del suelo.

Los resultados mostraron que todas las dosis de fertilizantes redujeron el pH del suelo después de tres años de aplicación tanto en el sistema maíz-frijol como en el monocultivo. Sin embargo, se observó que al tercer año la dosis alta redujo el pH del suelo de forma significativa ($p < 0.05$) en comparación con los otros tratamientos (Fig. 4.1). La disminución fue de 1.10 y 1.07 en comparación con la dosis baja y media, respectivamente. No se encontraron influencias significativas del monocultivo o la rotación, ni su interacción con las combinaciones de N+P, en el pH del suelo. En cuanto a la concentración de carbono (C) y nitrógeno total (N) en el suelo, no se observaron efectos significativos de los tratamientos ni de la interacción entre las dosis de fertilizante y el monocultivo o la rotación (Fig. 4.2 y 4.3). Sin embargo, para el C se observó que a partir de segundo año el monocultivo presentó una concentración mayor en el suelo respecto a la rotación (Fig. 4.2). Al tercer año las dosis de fertilizantes produjeron una concentración 1.1 veces más alta de C en el suelo del monocultivo comparado con la rotación.

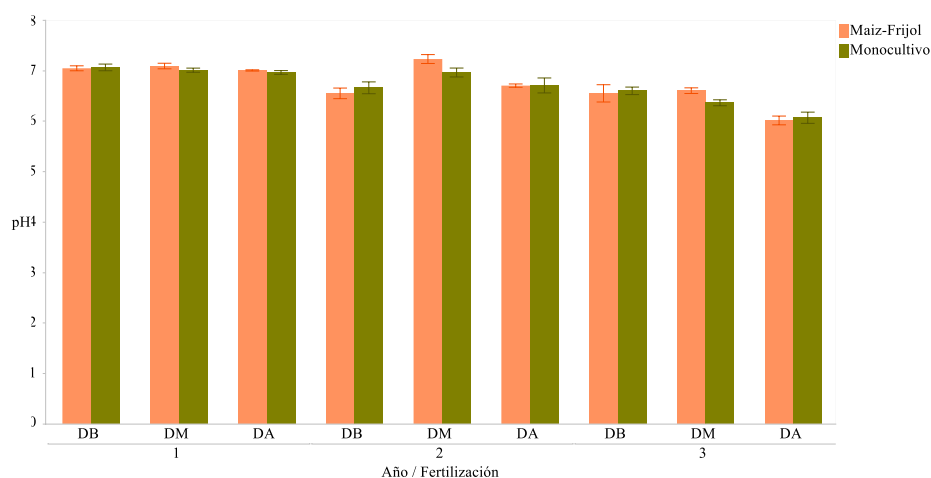


Fig. 4.1. Dinámica de pH de suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

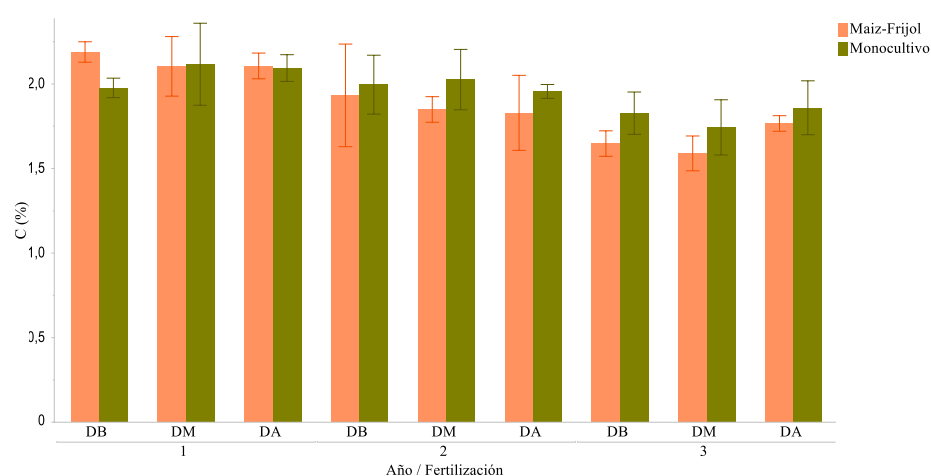


Fig. 4.2. Concentración del carbono (%) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

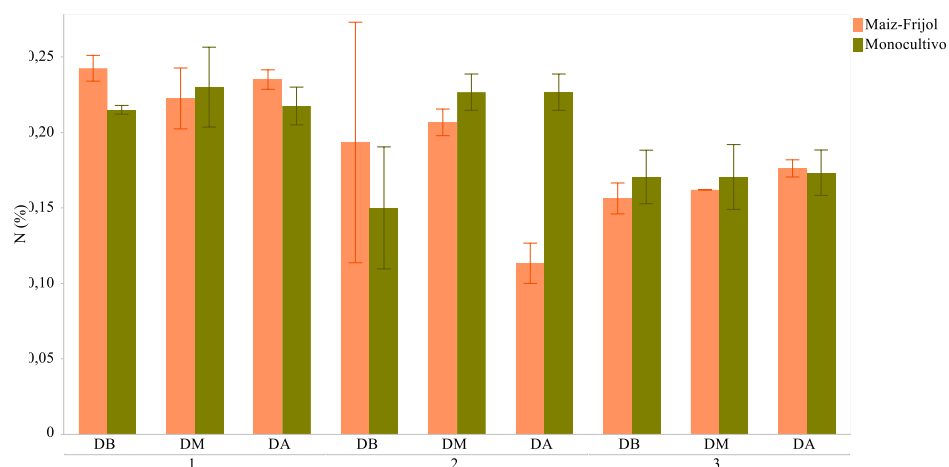


Fig. 4.3. Concentración del N (%) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

La concentración de NH_4^+ en el suelo mostró variaciones entre el segundo y tercer año de evaluación, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de NH_4^+ debido a las diferentes dosis de fertilizante (Fig. 4.4). Durante el segundo año, las concentraciones de NH_4^+ en las dosis media y alta fueron 3.4 y 1.6 veces mayores, respectivamente, en comparación con la dosis baja. Sin embargo, en el tercer año, las concentraciones de NH_4^+ en las dosis baja y alta fueron 1.5 y 1.7 veces mayores, respectivamente, en comparación con la dosis media. Además, la concentración de NH_4^+ también se vio afectada por el tipo de sistema, siendo 1.31 veces mayor ($p < 0.01$) en el monocultivo en comparación con la rotación durante el tercer año (Fig. 4.4).

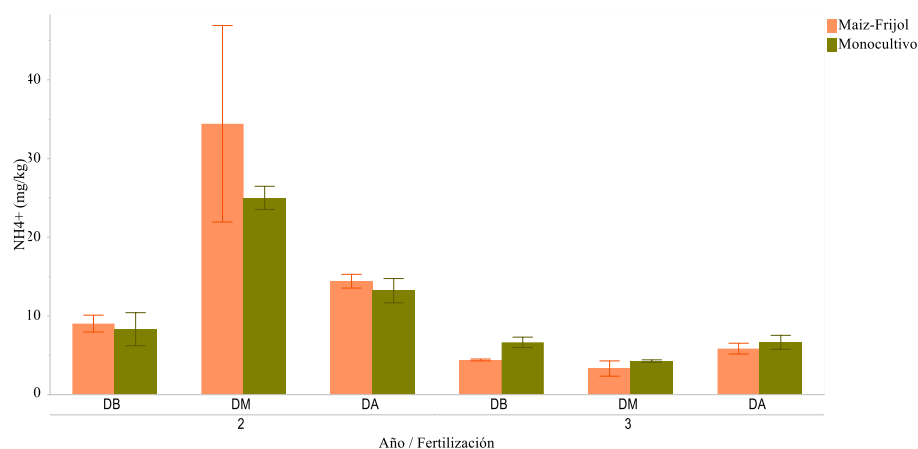


Fig. 4.4. Concentración del NH_4^+ (mg/kg) en el suelo durante el segundo y tercer año de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

En cuanto a la concentración de NO_3^- en el suelo, esta fue influenciada por las dosis de fertilizante y la rotación durante el tercer año. Se observaron diferencias ($p < 0.01$) en la concentración de NO_3^- de la dosis alta comparada a las dosis baja y media, así como entre el monocultivo de maíz y la rotación maíz-frijol (Fig. 4.5). La concentración de NO_3^- en la dosis alta fue 7.8 y 4.6 veces mayor en comparación con las dosis baja y

media, respectivamente. Además, la concentración de NO_3^- fue 2.6 veces mayor en el monocultivo en comparación con la rotación. No se observaron efectos de interacción entre las dosis de fertilizante y el tipo de cultivo en las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- .

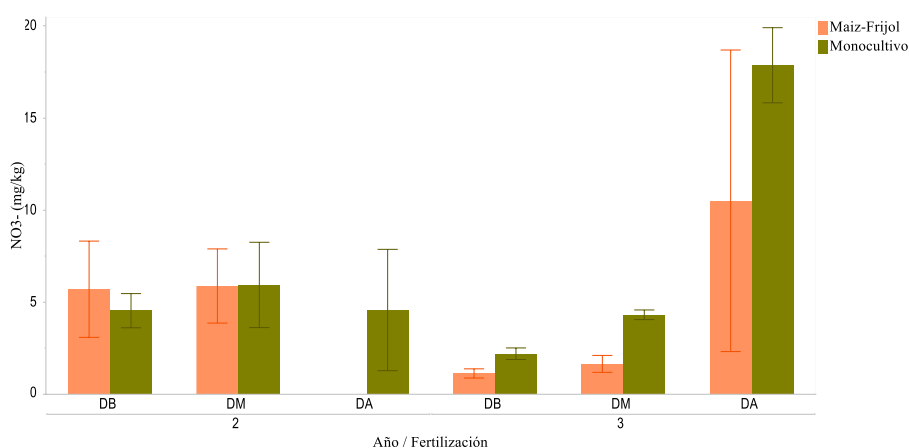


Fig. 4.5. Concentración del NO_3^- (mg/kg) en el suelo durante el segundo y tercer año de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en la concentración de P en el suelo debido a la fertilización durante el segundo y tercer año del estudio (Fig. 4.6). En el segundo año, la concentración de P en el suelo fue igual entre las dosis baja y alta, mientras que comparado a la dosis media ambas dosis fueron 4 veces mayor. En el tercer año, a pesar de la diferencia encontrada entre la concentración de P por efecto de la dosis baja comparada a las dosis media y alta; estos resultados deben ser tomados con cautela ya que las concentraciones fueron por debajo al límite de cuantificación y no reflejan la

dosís P aplicadas en suelo. No se observaron efectos de interacción entre las dosís de fertilizante y el tipo de cultivo.

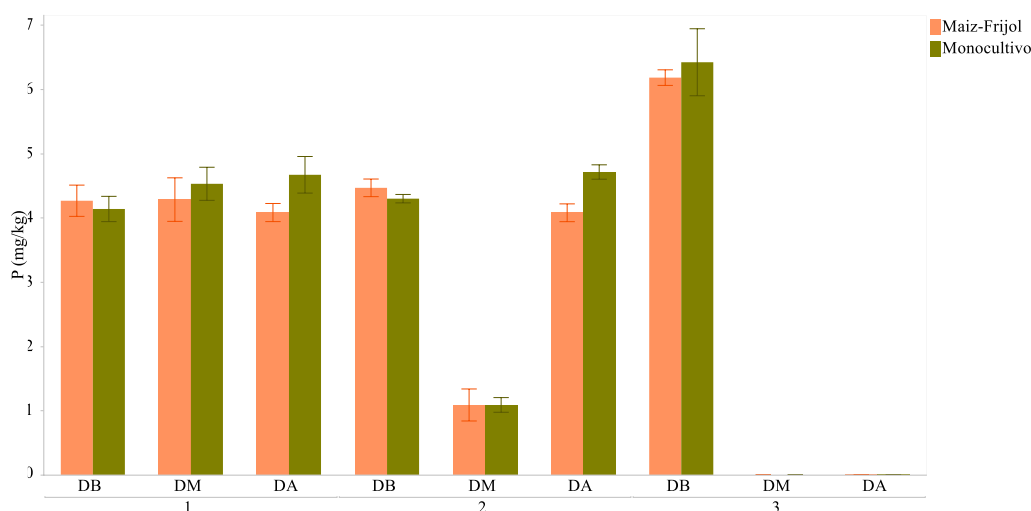


Fig. 4.6. Concentración de P (mg/kg) en el suelo durante tres años de aplicación de combinaciones N+P en el sistema maíz-frijol y monocultivo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

4.2 Efecto del N+P sobre la actividad enzimática de la rotación y monocultivo.

No se encontró un efecto significativo de las dosís de fertilizantes aplicadas en la actividad de las enzimas que intervienen en el proceso de la mineralización de N (NAG+LAP) en el suelo (Fig. 8). Sin embargo, en el tercer año en la rotación maíz-frijol se observó que la dosis baja presentó una actividad 1.06 y 1.09 veces mayor en comparación con la actividad determinada en la dosis media y alta, respectivamente (Fig. 4.7). Aunque no se encontró un efecto significativo de la rotación maíz-frijol en la actividad enzimática, en el tercer año se observó una actividad 1.13 veces mayor en comparación con el monocultivo (Fig. 4.7).

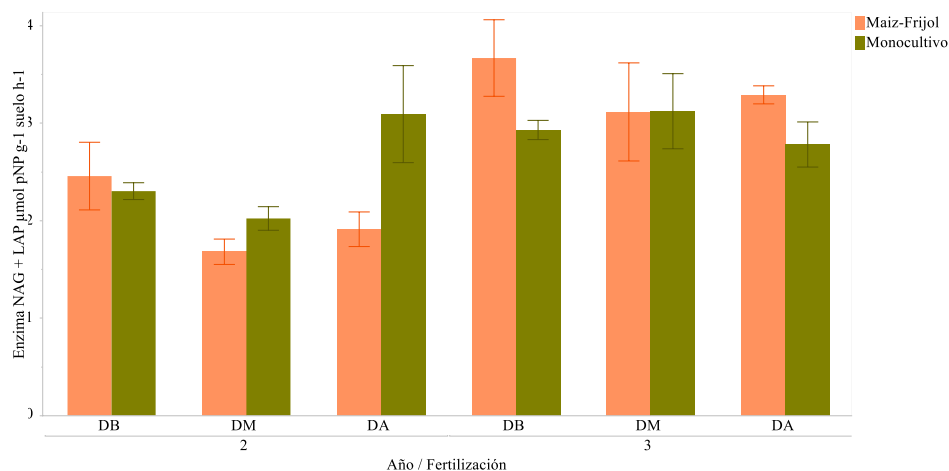


Fig. 4.7. Actividad β -1,4-N-acetilglucosaminidasa+leucina aminopeptidasa (NAG+LAP) ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistemas maíz-frijol y monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

Durante el periodo evaluado la actividad BG producto de la dosis media se mantuvo inferior respecto a las dosis baja y alta. En el segundo año la actividad enzimática fue mayor ($p < 0.05$) en las dosis baja y alta en comparación con la dosis media (Fig. 4.8). En este periodo, la actividad de la enzima BG fue 1.4 veces mayor en las dosis baja y alta en comparación con la dosis media. En el tercer año, la diferencia en la actividad enzimática entre las dosis baja y alta de fertilizante fue 1.25 veces mayor en comparación con la dosis media.

En cuanto a la rotación maíz-frijol, se observó un efecto significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima BG durante el segundo año (Fig. 4.8), pero no en el tercer año. Durante el segundo año, la actividad enzimática en el monocultivo fue 1.35 veces mayor que en la rotación con frijol. En el tercer año, se mantuvo una tendencia similar, aunque no se encontró la misma diferencia. La actividad enzimática en el monocultivo fue 1.13 veces mayor en comparación con la rotación.

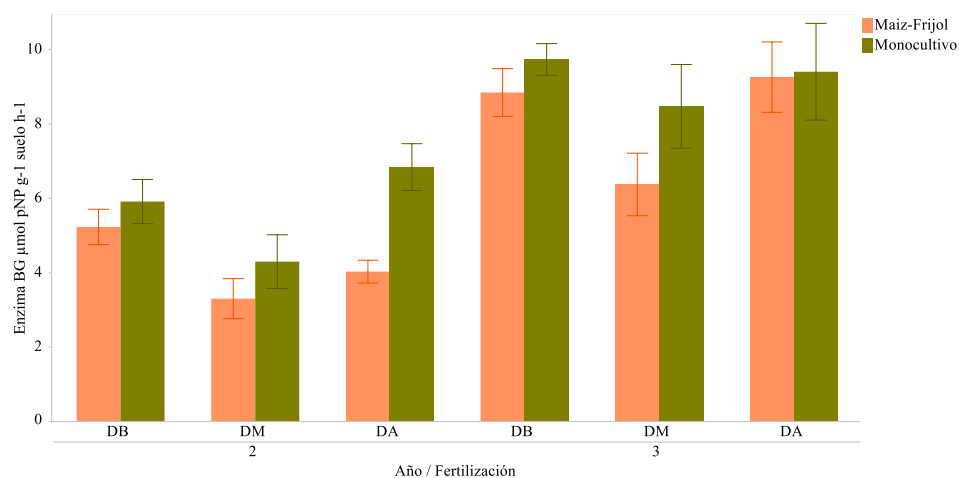


Fig. 4.8. Actividad β -1,4 glucosidasa (BG) ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistema maíz-frijol y monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

En el segundo año, al igual que con la enzima BG, la fertilización con dosis baja y alta produjo la mayor actividad de la enzima FME en el suelo ($p < 0.05$) en comparación con la dosis media (Fig. 4.9). En el segundo año, la actividad enzimática debido a la dosis baja y alta fue 1.34 y 1.12 veces mayor, respectivamente. En el tercer año, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.11$), la actividad enzimática en la dosis baja y alta fue 1.21 y 1.14 veces mayor en comparación con la dosis media.

En cuanto a los sistemas, aunque no se observó un efecto significativo (Año 2, $p = 0.55$; Año 3, $p = 0.11$), se pudo notar una tendencia de una mayor actividad enzimática en el monocultivo en comparación con la rotación (Fig. 4.9).

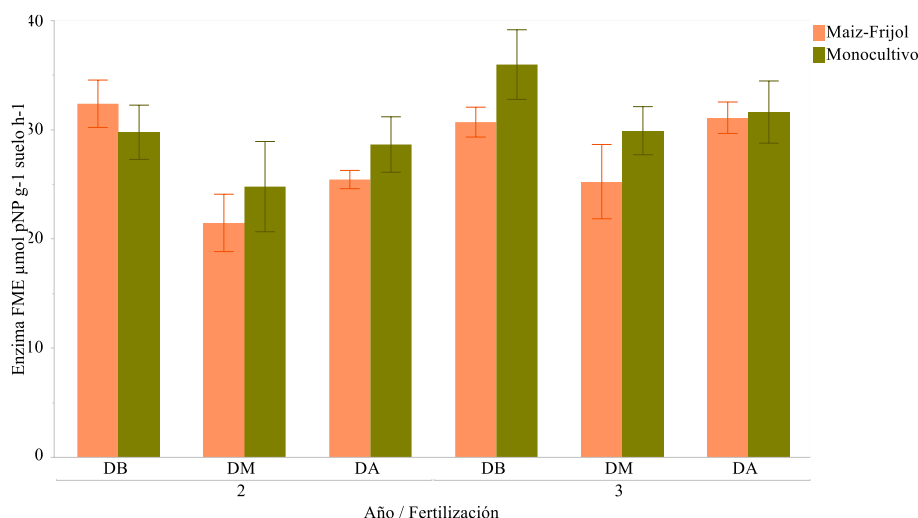
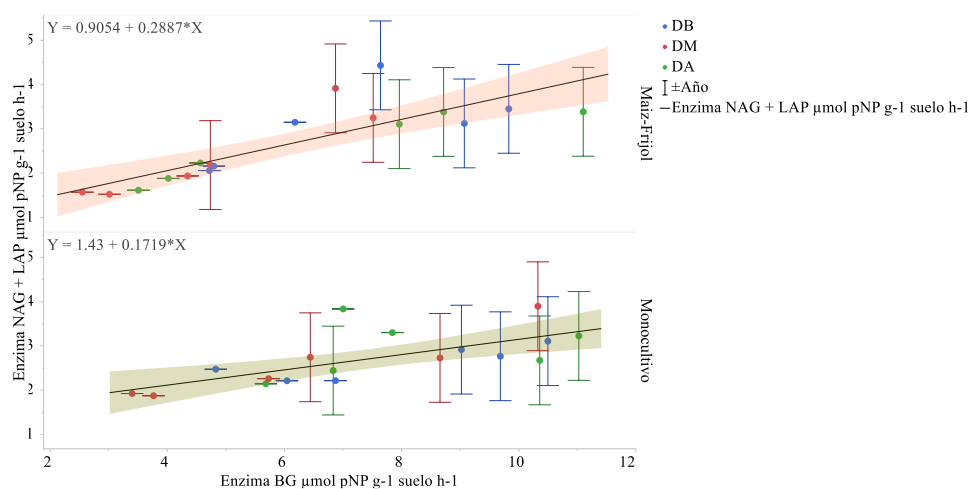


Fig. 4.9. Actividad Fosfomonoesterasa (FME) (pNP g⁻¹ suelo h⁻¹) durante el segundo y tercer año por dosis combinadas de N+P en sistemas maíz-frijol y monocultivo DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40) (B) actividad FME por rotación maíz-frijol y monocultivo. Barras representan la desviación estándar de tres replicas.

Adicionalmente, se encontraron relaciones positivas significativas en la actividad de las enzimas NAG+LAP y BG tanto en el monocultivo ($R^2=0.47$, $p<0.01$) como en la rotación maíz-frijol ($R^2=0.68$, $p<0.01$). Por otro lado, se observó una relación positiva significativa entre la actividad enzimática de NAG+LAP y FME exclusivamente en la rotación maíz-frijol ($R^2=0.31$, $p=0.01$) (Fig. 4.10 A y B). Además, se encontró una relación significativa y positiva entre la actividad enzimática de BG y FME tanto en el monocultivo ($R^2=0.41$, $p<0.01$) como en la rotación maíz-frijol ($R^2=0.38$, $p=0.005$) (Fig. 4.11).

A)



B)

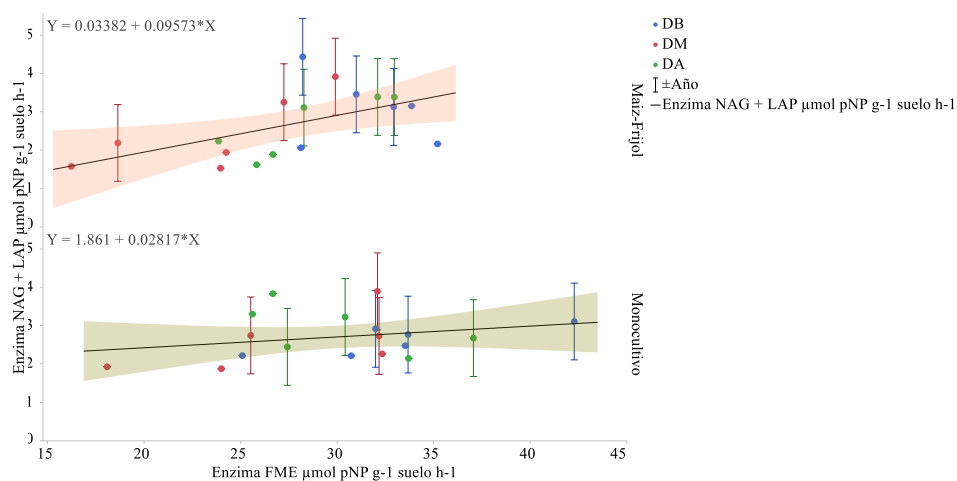


Fig. 4.10. Relación entre actividad enzimática (pNP g⁻¹ suelo h⁻¹) de: A) β-1,4-N-acetylglucosaminidasa + Leucina aminopeptidasa (NAG+LAP) y β-1,4 glucosidasa (BG). B) NAG+LAP y Fosfomonoesterasa (FME). Círculos representan la relación de actividad enzimática por dosis combinadas N+P. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres réplicas de año dos y tres.

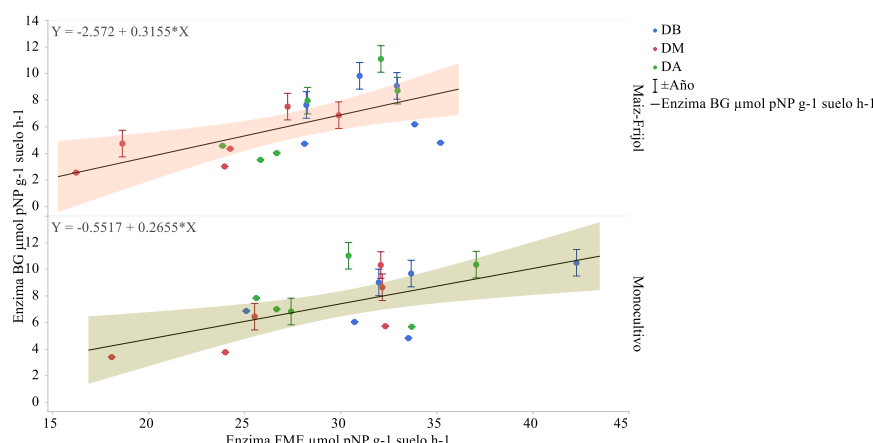


Fig. 4.11. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) – Fosfomonoesterasa (FME). Círculos representan la relación de actividad enzimática por dosis combinadas N+P. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA=dosis alta (200+40). Barras representan la desviación estándar de tres réplicas de año dos y tres.

4.3 Análisis temporal de la actividad enzimática y los contenidos C, N y P.

La actividad potencial de las enzimas β -1,4 glucosidasa y fosfomonoesterasa se relacionaron con el contenido de C presente en el suelo. Al tercer año de evaluación, se observó una relación significativa y positiva entre la concentración de la enzima β -1,4 glucosidasa y el C en el monocultivo maíz ($R^2=0.48$, $p=0.038$, Fig. 4.12), y una tendencia similar en maíz-frijol ($R^2=0.31$, $p=0.121$, Fig. 4.13).

La enzima fosfomonoesterasa mostró una relación significativa y positiva durante los años dos ($R^2=0.48$, $p=0.039$, Fig. 4.14) y tres ($R^2=0.60$, $p=0.014$, Fig. 4.14) en el monocultivo, y en el tercer año de la rotación maíz-frijol ($R^2=0.58$, $p=0.016$, Fig. 4.15). También se observó una relación positiva (no significativa) entre el contenido de C y la actividad de la enzima fosfomonoesterasa en la rotación durante el segundo año (Fig. 4.15). No se encontraron relaciones significativas entre la actividad de NAG+LAP o FME y los contenidos de nitrógeno (N) y fósforo (P) en el suelo.

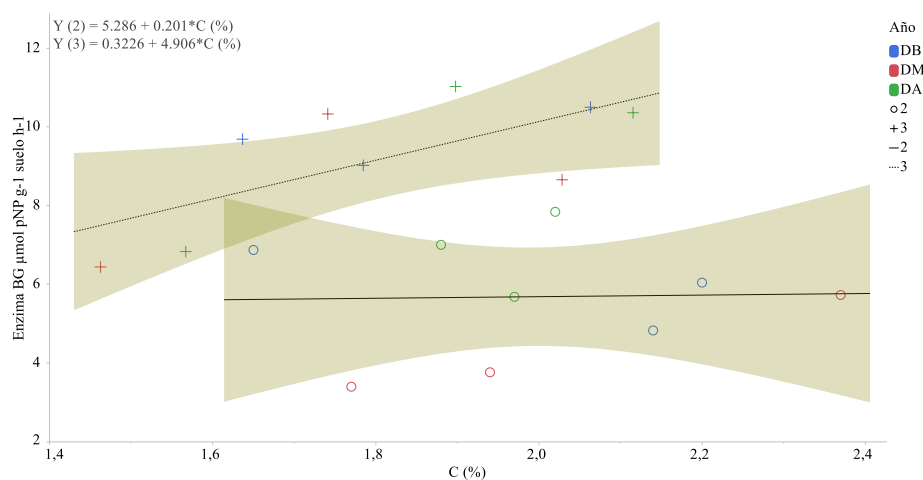


Fig. 4.12. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) (monocultivo maíz) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

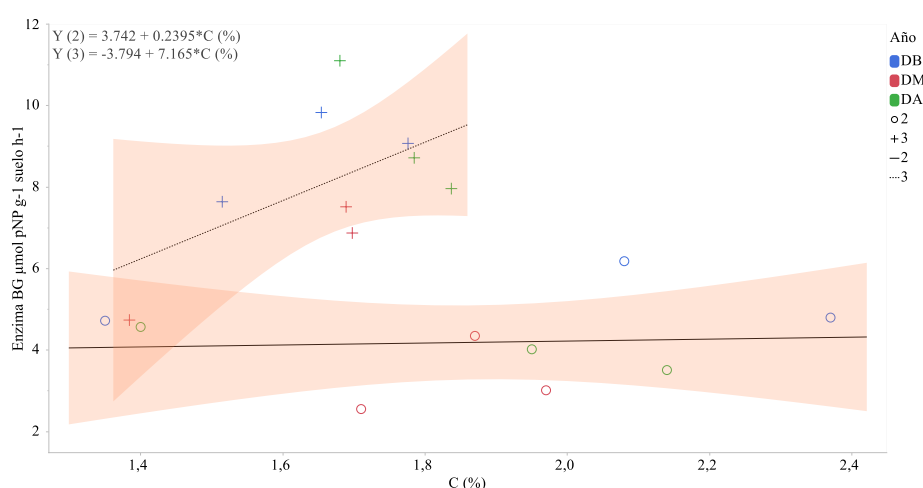


Fig. 4.13. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) β -1,4 glucosidasa (BG) (maíz-frijol) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

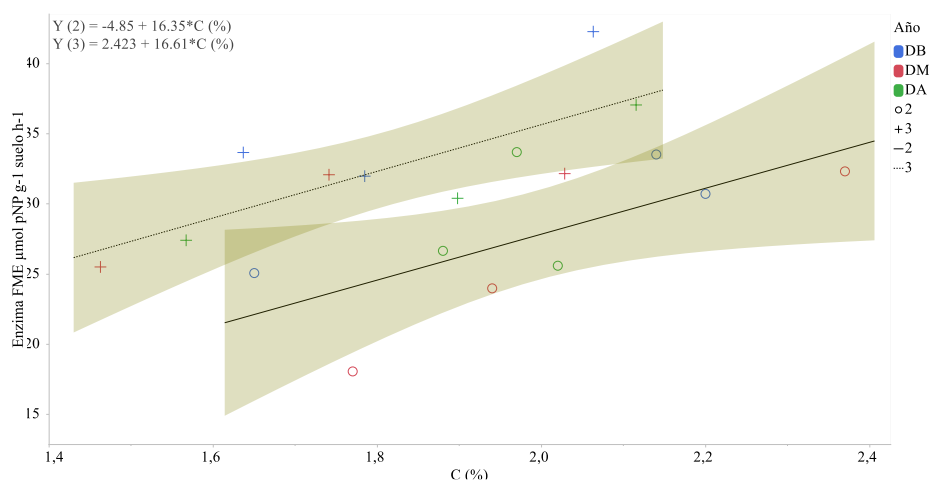


Fig. 4.14. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) Fosfomonoesterasa (FME) (monocultivo maíz) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

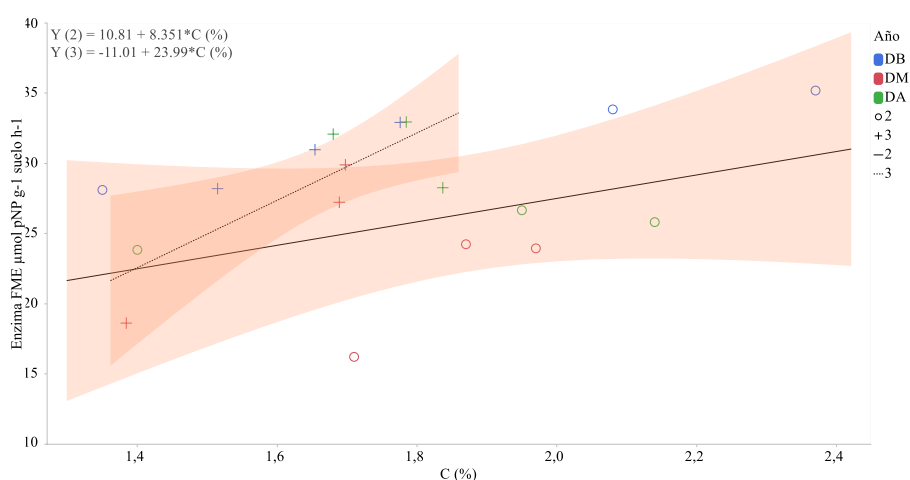


Fig. 4.15. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) Fosfomonoesterasa (FME) (maíz-frijol) con el contenido de C del suelo. Línea continua= relación año dos; Línea cuadrícula= relación año tres. Circulo (°) representa la combinación de fertilizante (N+P) año dos. Cruz (+) representa la combinación de fertilizante (N+P) año tres. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

4.4 El pH del suelo y su efecto en la actividad enzimática del N, P y C.

Los resultados revelan una relación negativa entre los valores de pH alcalinos y la actividad enzimática en el suelo, para las enzimas BG, NAG+LAP y PME. Durante el período de evaluación, el pH del suelo varió entre 6.01 y 7.2 (Fig. 4.1).

A medida que los valores de pH se acercaron a la neutralidad, se observó un aumento en la actividad enzimática en todas las enzimas analizadas (Fig. 4.16, 4.17 y 4.18). Se encontraron relaciones significativas ($p < 0.05$) entre el pH y la actividad de las enzimas NAG+LAP ($R^2 = 0.33$, $p = 0.012$), BG ($R^2 = 0.47$, $p = 0.0017$) y FME ($R^2 = 0.32$, $p = 0.013$) en la rotación maíz-frijol. En el caso del monocultivo, solo se observó una relación significativa entre el pH y la actividad de la enzima BG ($R^2 = 0.341$, $p = 0.013$).

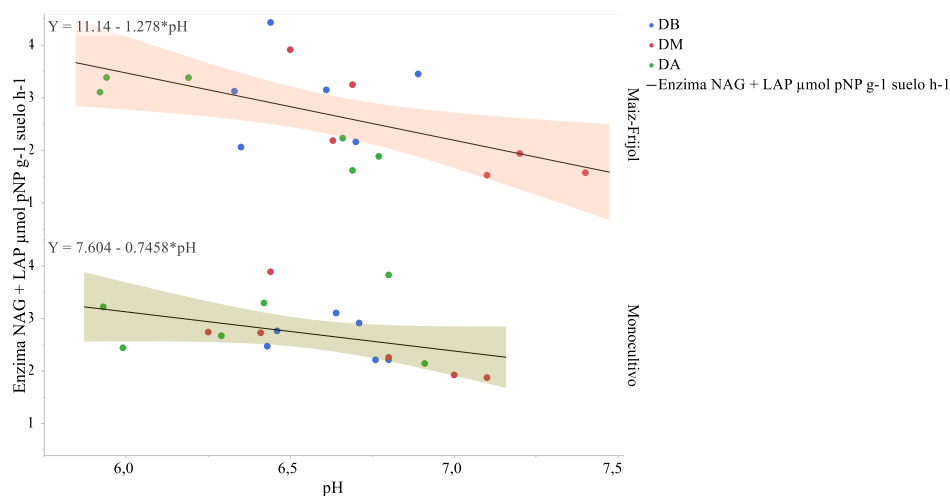


Fig. 4.16. Relación entre actividad enzimática ($\text{pNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}$) NAG = β -1,4-N-acetilglucosaminidasa+LAP = leucina aminopeptidasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

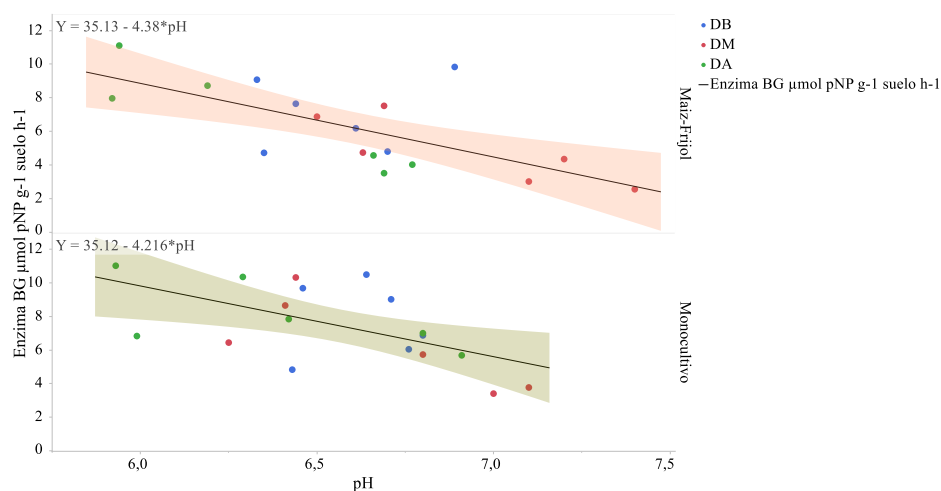


Fig. 4.17. Relación entre actividad enzimática (pNP g⁻¹ suelo h⁻¹) BG = β-1,4 glucosidasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

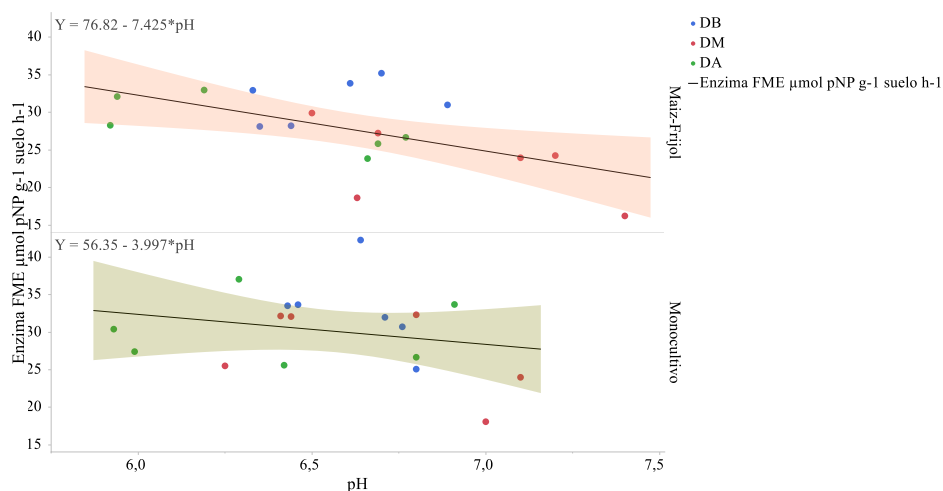


Fig. 4.18. Relación entre actividad enzimática (pNP g⁻¹ suelo h⁻¹) PME = fosfomonoesterasa y el pH del suelo. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

4.5 Efecto de la aplicación de N+P en las bacterias oxidantes de amónico y nitrito.

El número de Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) presentes en el suelo para las bacterias oxidantes de amonio (BOA) y las bacterias oxidantes de nitrito (BON)

mostró variaciones según las dosis de fertilizantes aplicadas y el tipo de siembra, ya sea monocultivo o rotación con frijol. Se observó que la dosis media de fertilizante resultó en una mayor abundancia de UTOs en ambos grupos bacterianos, tanto en el monocultivo como en la rotación maíz-frijol. En la rotación, la dosis media incrementó la presencia de UTOs en las BOA en un 21% y un 13% en comparación con las dosis baja y alta, respectivamente. En el monocultivo, las dosis alta y media de fertilizantes aumentaron la abundancia de UTOs en las BOA en un 18% en comparación con la dosis baja. En cuanto a las BON, en la rotación, la dosis media condujo a un aumento del 6% y 18% en UTOs en comparación con las dosis baja y alta, respectivamente. Del mismo modo, en el monocultivo, la dosis media resultó en un incremento del 23% y 55% en UTOs en comparación con las dosis baja y alta, respectivamente. Estos resultados indican que la aplicación de una dosis media de fertilizante puede promover el desarrollo y la diversidad de las comunidades bacterianas relacionadas con la nitrificación en el suelo, tanto en el monocultivo como en la rotación maíz-frijol.

Comparando el monocultivo y la rotación maíz-frijol, se observó que la rotación favorece un mayor número de UTOs de bacterias oxidantes de amonio (BOA), mientras que en el monocultivo se encontraron más UTOs de bacterias oxidantes de nitrito (BON). De los UTOs totales encontrados en el monocultivo (74) y la rotación maíz-frijol (63) bajo las diferentes dosis de fertilizantes aplicados, se determinó que el porcentaje de UTOs similares de BON fue del 15% y 19%, respectivamente (Fig. 4.19). En cuanto a las BOA, se encontraron UTOs similares en un 53% en el monocultivo (17) y en un 15% en la rotación maíz-frijol (34) (Fig. 4.19)

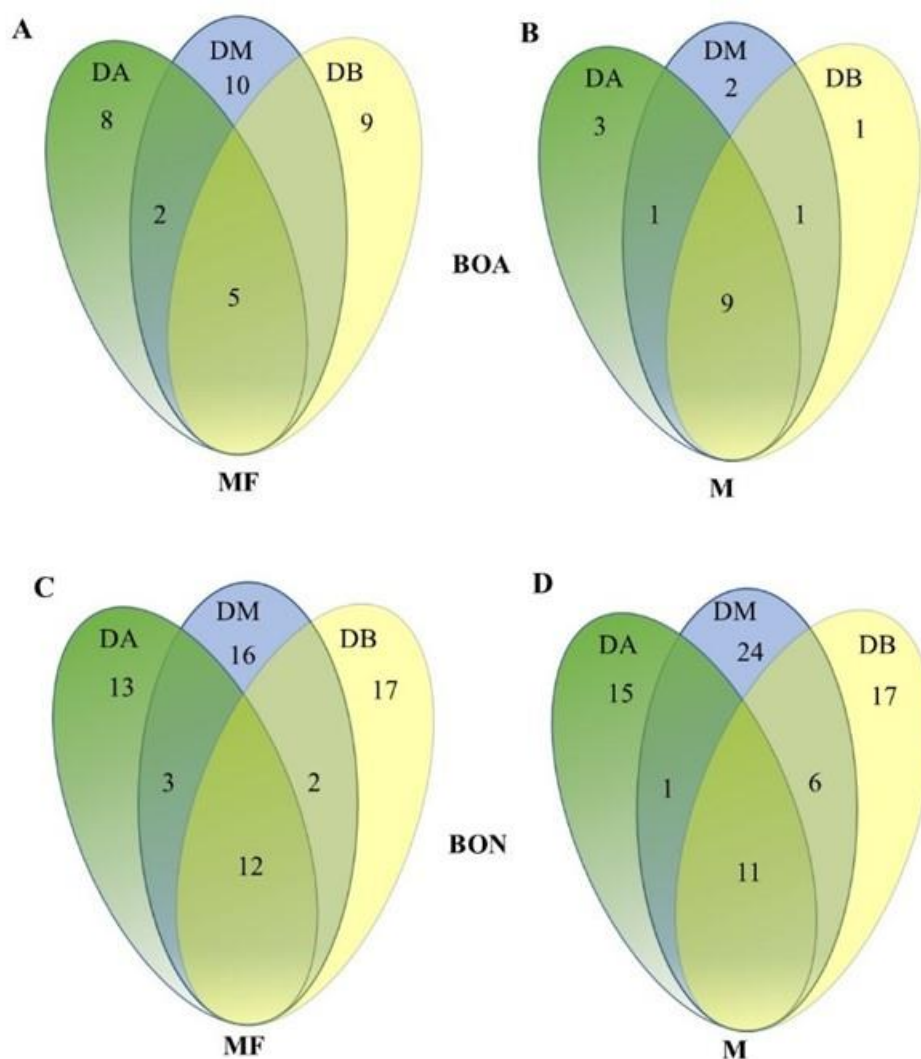


Fig. 4.19. Diagramas de Venn muestran el número de UTOs únicos y semejantes entre las comunidades de bacterias que intervienen en el ciclo de nitrógeno. (A) y (B) UTOs de BOA (Bacterias oxidantes de amonio) de la rotación maíz-frijol y monocultivo, respectivamente. (C) y (D) UTOs de BON (Bacterias oxidantes de nitritos) de la rotación maíz-frijol y monocultivo, respectivamente. DB = dosis baja (50+10), DM = dosis media (150 + 30), DA = dosis alta (200 + 40).

4.6 Estructura de Unidades Taxonómicas Operacionales por dosis de fertilizantes aplicados.

El análisis ANOSIM de las UTOs de *Nitrobacter spp.* y *Nitrosomonas spp.* no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la estructura de las comunidades presentes en el suelo. Esto indica que las UTOs de BOA (R-MF: 0,34; R-MM: 0,16) y BON (R-MF: 0,30; R-MM: 0,10) en el monocultivo y rotación no mostraron diferencias debido a los tratamientos (Fig. 4.20, 4.21, 4.22 y 4.23). Además, se presenta el dendrograma de similitud de UTOs basado en el índice de Jaccard para BOA y BON en función de los tratamientos utilizando el algoritmo UPGMA (Fig. 4.24, 4.25, 4.26 y 4.27).

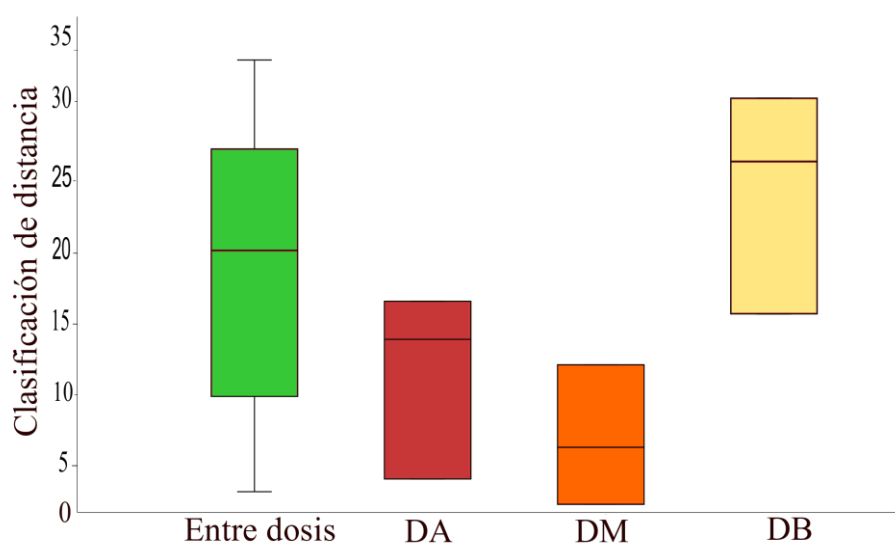


Fig. 4.20. Análisis de la estructura de las BON (bacterias oxidantes de nitritos) por dosis combinadas N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

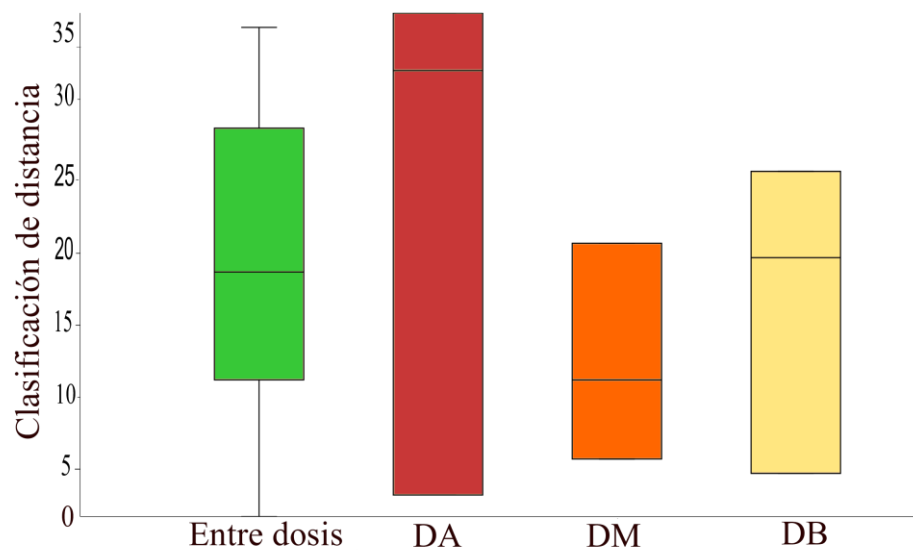


Fig. 4.21. Análisis de la estructura de las BON (bacterias oxidantes de nitritos) por dosis combinadas N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

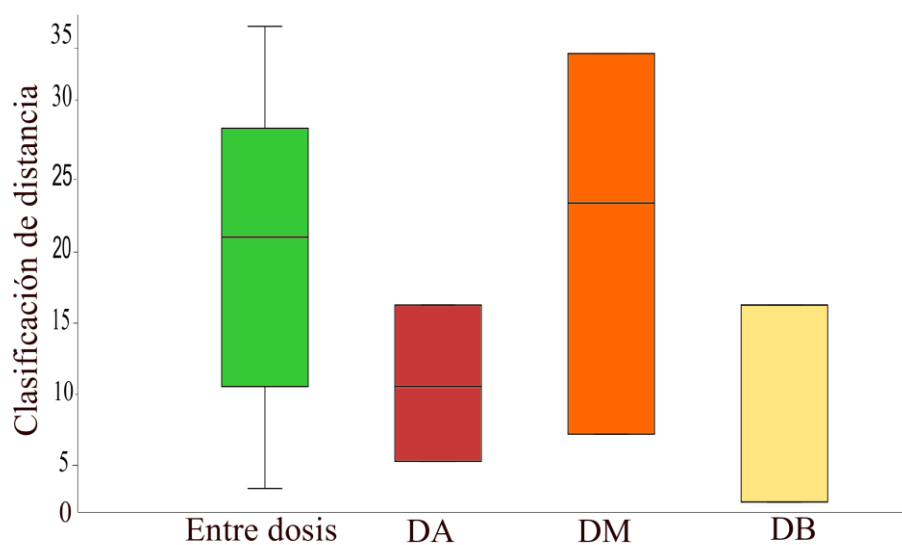


Fig. 4.22. Análisis de la estructura de las BOA (bacterias oxidantes de amonio) por dosis combinadas N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

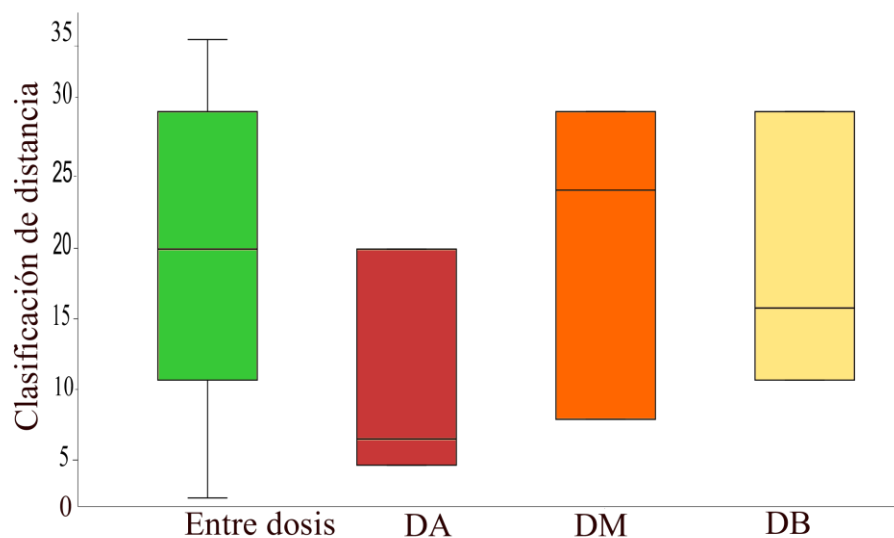


Fig. 4.23 Análisis de la estructura de las BOA (Bacterias oxidantes de amonio) por dosis combinadas N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

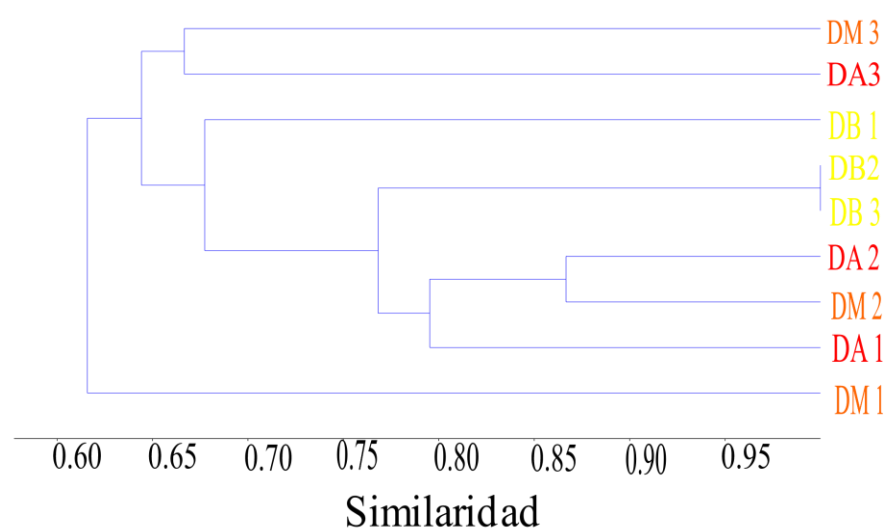


Fig. 4.24. Clasificación de las UTOs de las BOA (Bacterias oxidantes de amonio) según índice de Jaccard por combinación N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

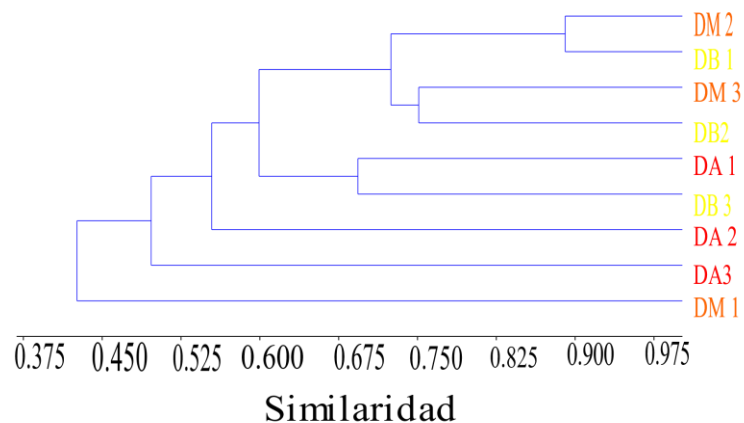


Fig. 4.25. Clasificación de las UTOs de las BOA (bacterias oxidantes de amonio) según índice de Jaccard por combinación N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

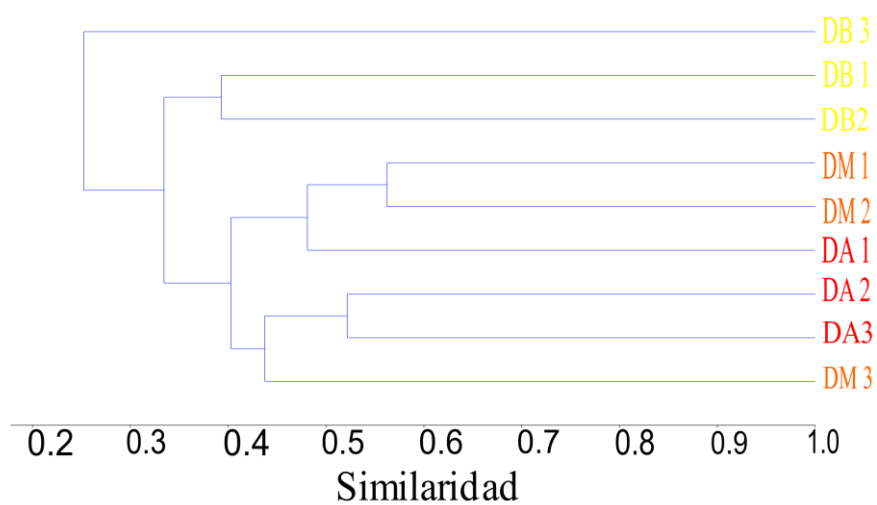


Fig. 4.26. Clasificación de las UTOs de las BON (bacterias oxidantes de nitrito) según índice de Jaccard por combinación N+P en la rotación maíz-frijol. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

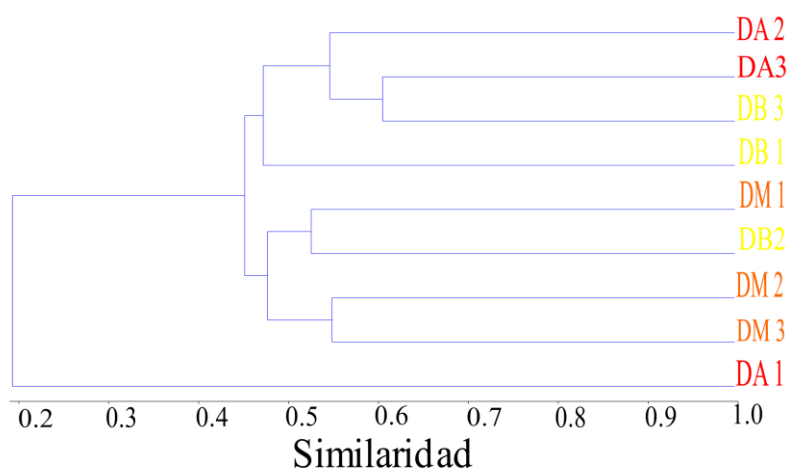


Fig. 4.27. Clasificación de las UTOs de las BON (Bacterias oxidantes de nitrito) según índice de Jaccard por combinación N+P en monocultivo. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

4.7 Similitud de Unidades Taxonómicas Operacionales (UTOs) de BOA y BON dentro de la rotación maíz-frijol y monocultivo.

Los análisis de agrupamiento basados en el índice de Jaccard y el algoritmo UPGMA revelaron una clara diferenciación entre los grupos de OTUs de las BON y BOA en el monocultivo y en la rotación maíz-frijol (Fig. 4.28 y 4.29). Estos hallazgos fueron respaldados por un análisis de dos vías (ANOSIM) que mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los UTOs del monocultivo y la rotación maíz-frijol (Fig. 4.30 y 4.31). Los valores de p y R de disimilitud para el grupo de BON y BOA fueron de 0,002 y 0,5, y 0,0005 y 0,89, respectivamente. Estos resultados sugieren que las comunidades de BON y BOA fueron influenciadas por la elección entre monocultivo y rotación durante el período de evaluación.

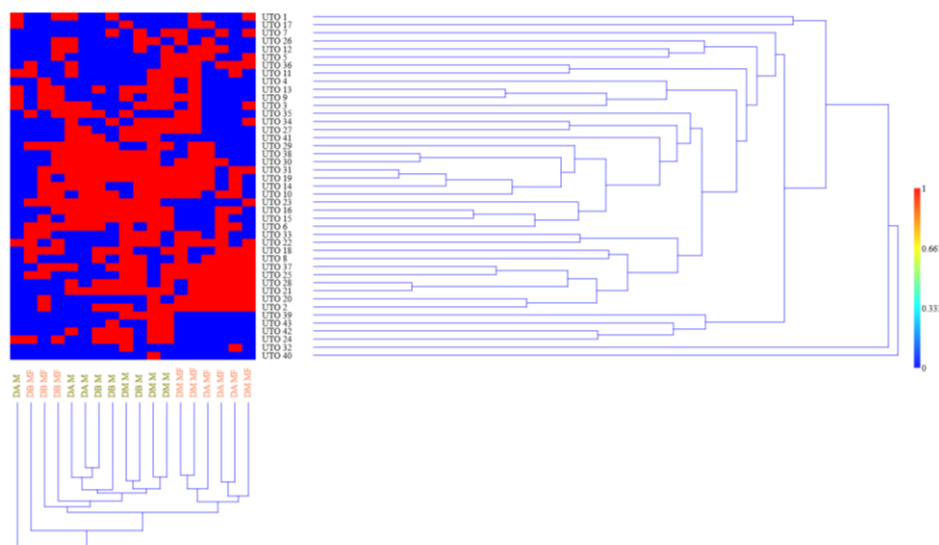


Fig. 4.28. Mapa de calor de Similaridad de Jaccard por dosis de fertilizantes para monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) está basado en la presencia y ausencia de los UTOs de bacterias oxidantes de nitrato. La presencia está identificada por el color rojo y la ausencia por el azul. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA=dosis alta (200+40).

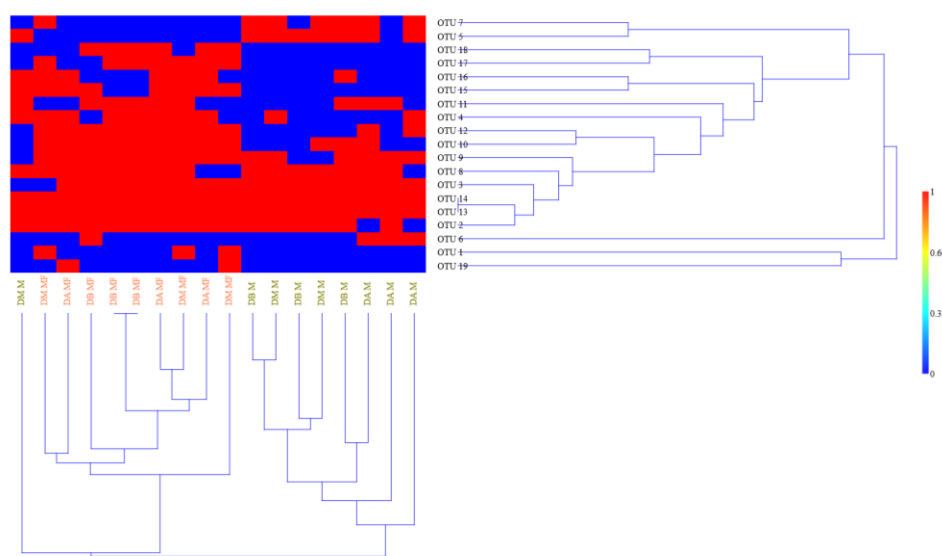


Fig. 4.29. Mapa de calor de Similaridad de Jaccard por dosis de fertilizantes para monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) está basado en la presencia y ausencia de los OTUs de bacterias oxidantes de amoníaco. La presencia está identificada por el color rojo y la ausencia por el azul. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA=dosis alta (200+40).

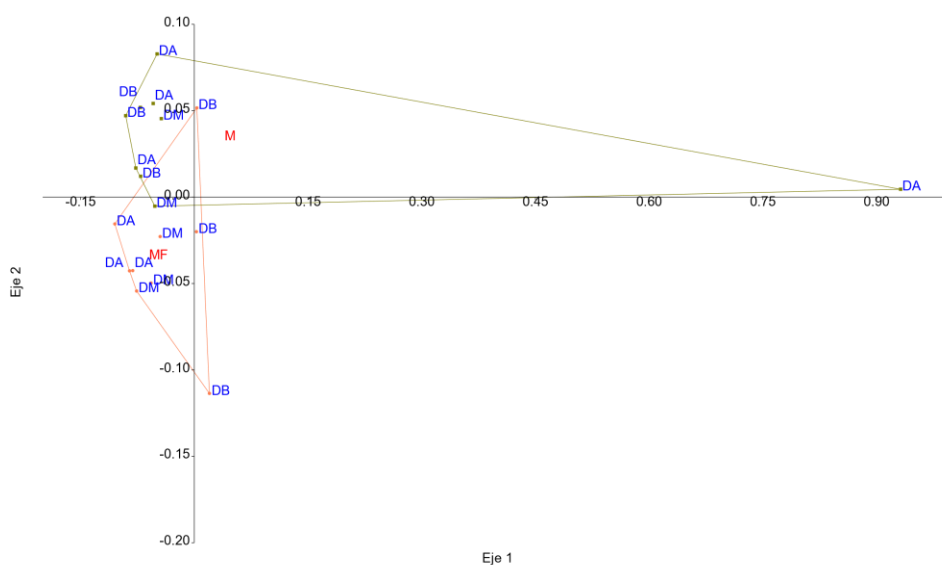


Fig. 4.30. Escalamiento multidimensional no métrico por monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para el grupo de bacterias oxidantes de nitrito. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

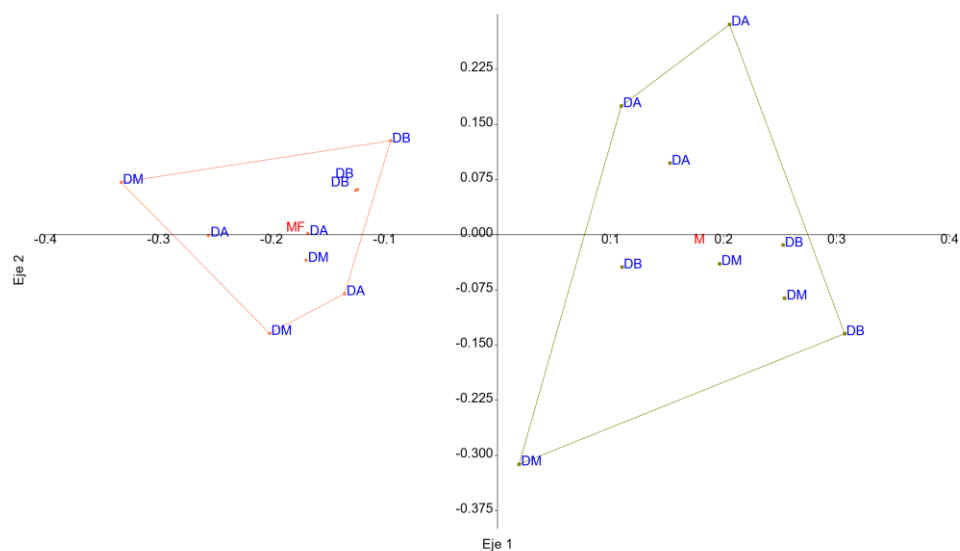


Fig. 4.31. Escalamiento multidimensional no métrico por monocultivo (M) y rotación y maíz-frijol (MF) para el grupo de bacterias oxidantes de amoniac. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

4.8 Análisis de correspondencia canónica por dosis de fertilizantes aplicados y siembra en monocultivo o rotación.

Se llevó a cabo un análisis de correspondencia canónica para investigar la relación entre las variables químicas y las enzimas del suelo con los diferentes tratamientos y rotaciones, como se muestra en las Figuras 4.32 y 4.33, y Figuras 4.34 y 4.35, respectivamente. En el caso de la rotación maíz-frijol, se observó que las enzimas involucradas en los ciclos del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) se relacionaron principalmente con los suelos que recibieron la dosis baja de fertilizantes. El pH, NO_3^- y NH_4^+ mostraron una correlación significativa con los suelos que recibieron la dosis media, mientras que la dosis alta no mostró una relación clara con las variables evaluadas. Además, se encontró una fuerte correlación entre el contenido de C y P en el suelo y las enzimas NAG+LAP, BG y FME, mientras que el pH mostró una alta correlación con el NH_4^+ . En conjunto, estos ejes explicaron el 56,86% de la varianza en los datos.

En cuanto al monocultivo, las enzimas relacionadas con los ciclos de C, N y P mostraron una relación con los tres tratamientos evaluados. El P mostró una mayor correlación con las enzimas analizadas, mientras que el C, NO_3^- , NH_4^+ y pH no mostraron una relación significativa con estas enzimas en el sistema estudiado. En este caso, los ejes de la correspondencia canónica explicaron el 41,86% de la varianza en los datos. Además, se examinó la relación entre las variables químicas y biológicas específicas de las bacterias BOA y BON en la rotación maíz-frijol y el monocultivo. Se encontró que el monocultivo mostró una mayor relación con las enzimas BG, NAG+LAP y FME, independientemente

del grupo de bacterias analizado, mientras que la rotación maíz-frijol mostró una relación más estrecha con el pH del suelo. En el análisis combinado de ambos sistemas para el grupo de BON, los ejes de la correspondencia canónica explicaron el 44,29% de la varianza, mientras que para el grupo de BOA explicaron el 69,93% de la varianza.

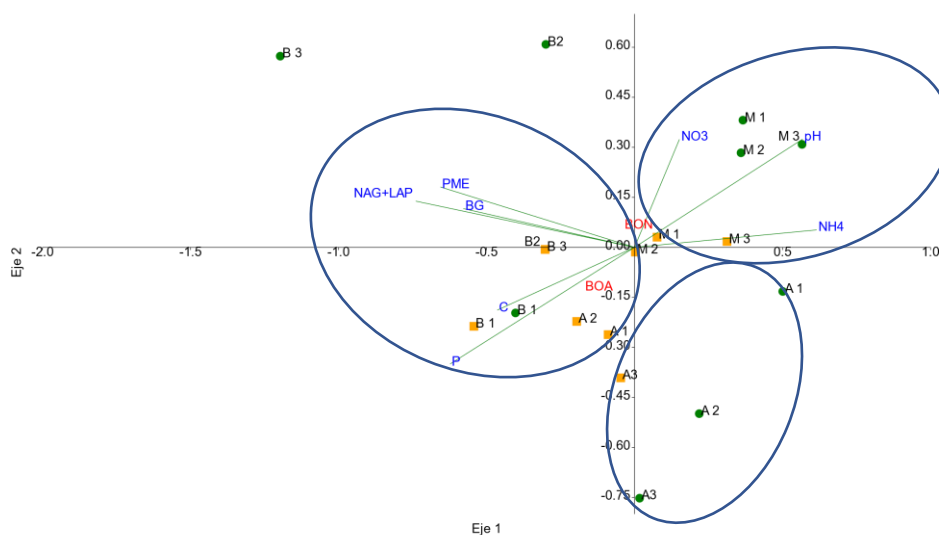


Fig. 4.32. Correspondencia canónica rotación maíz-frijol para las bacterias oxidantes de nitrito (BON) y bacterias oxidantes de amoníaco (BOA) (Log). Eje 1:32.59% Eje 2:24.27%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

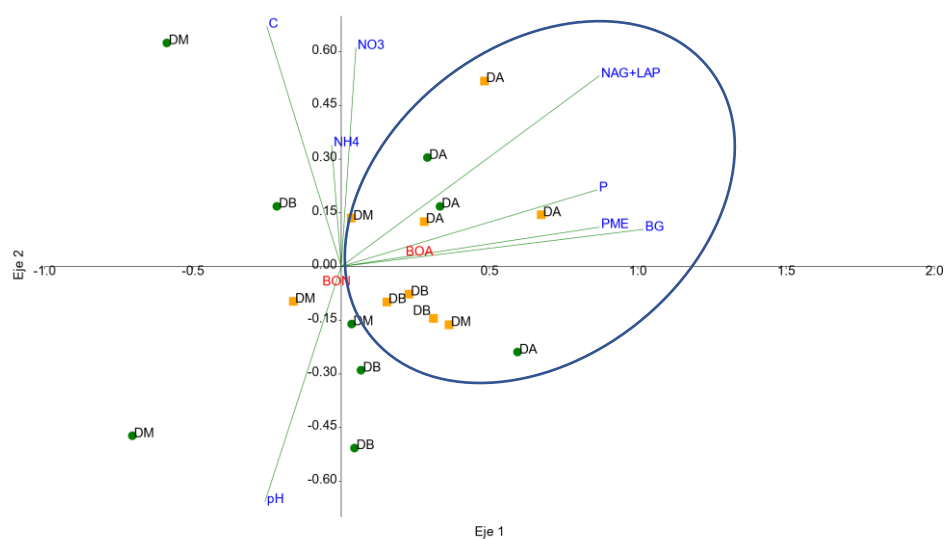


Fig. 4.33. Correspondencia canónica del monocultivo para las bacterias oxidantes de nitrito (BON) y bacterias oxidantes de amoníaco BOA (Log). Eje 1:23.36% Eje 2:18.5%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40)

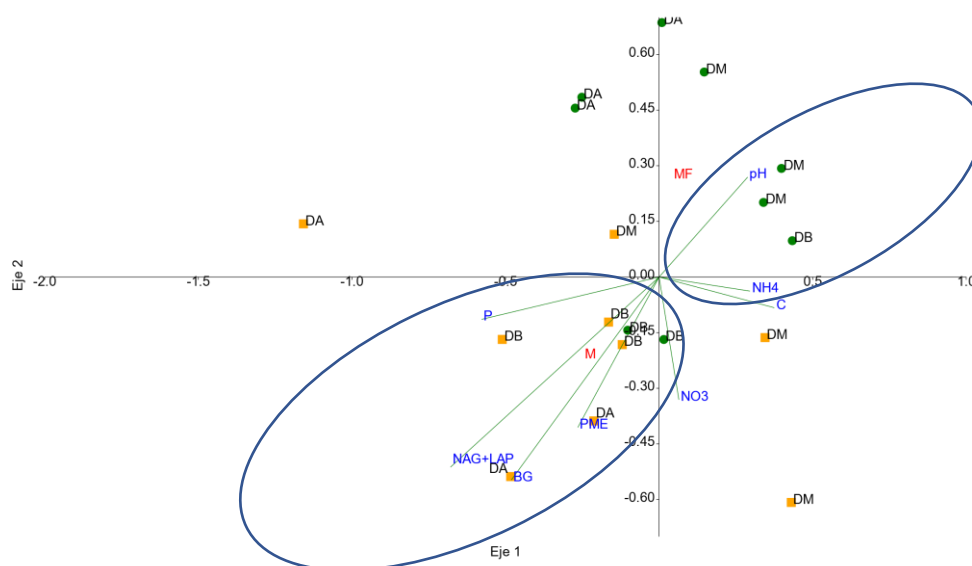


Fig. 4.34. Correspondencia canónica por monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para las bacterias oxidantes de nitrito (A). Eje 1: 23,91% Eje 2: 20,38%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

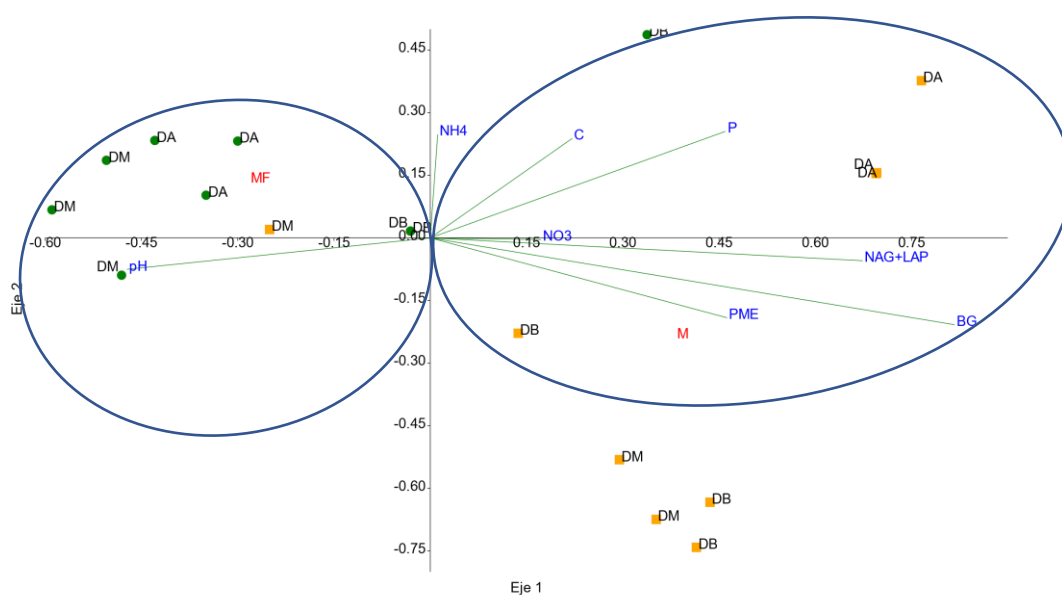


Fig. 4.35. Correspondencia canónica monocultivo (M) y rotación maíz-frijol (MF) para las bacterias oxidantes de amoníaco Eje 1: 48,86% Eje 2: 21,07%. DB=dosis baja (50+10); DM=dosis media (150+30); DA= dosis alta (200+40).

5 DISCUSIÓN

5.1 El pH y su efecto en las variables biogeoquímicas del suelo.

Los fertilizantes químicos son ampliamente utilizados para incrementar la producción agrícola (Dotaniya et al., 2018). El N y P son elementos fundamentales para este propósito, ya que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (B. L. Ma et al., 2016; Hasanuzzaman et al., 2018; Paz-Ares et al., 2022). Sin embargo; su uso prolongado tiene un impacto en las propiedades biogeoquímicas del suelo (Dar et al., 2021). Por ejemplo, el pH del suelo puede provocar la inactivación de las enzimas en el suelo, especialmente cuando son expuestas a rangos extremos (Frankenberger & Johanson, 1982). También; se ha demostrado que la aplicación de fertilizantes por tiempos prolongados puede llegar a modificar la abundancia y composición de las comunidades bacterianas en el suelo (J. Zhou et al., 2015; Nie et al., 2018; Singh et al., 2021), especialmente la adición de fertilizantes a base de N (H. Wang et al., 2018) alterando a grupos de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación (oxidación de NH_4^+ a NO_3^-)

En mi estudio se evaluó el efecto de tres dosis de fertilizantes sobre las enzimas responsables de despolimerizar compuestos orgánicos de N, P y C como la presencia de bacterias involucradas en la mineralización del N en la siembra de monocultivo o en rotación maíz-frijol. Los resultados mostraron que las dosis de N aplicadas no produjeron un efecto significativo en la actividad de las enzimas que intervienen en el paso previo para mineralizar el N (NAG+LAP) durante el tiempo evaluado, pero si tuvieron un impacto significativo en las enzimas que actúan sobre el C (β -glucosidasa)

y P (fosfomonoesterasa) durante el segundo año, aunque al tercer año no se detectó la misma diferencia entre las dosis aplicadas. La variación de la actividad enzimática del C y P entre el segundo y tercer año pudo deberse al pH del suelo. Se ha demostrado que la enzima β -Glucosidasa presenta una alta actividad en suelos con pH ácidos (pH = 3 y rangos de pH entre 4 y 5.25) y actividad intermedia en suelos con pH >5.5 y < 6.3, a la vez que no se registra actividad en suelos con pH alcalinos (Turner, 2010). De igual manera, para la enzima fosfatasa Turner, (2010) y Puissant et al., (2019) encontraron una alta actividad de ácido fosfomonoesterasa a valores de pH menores a 4, mientras que Acosta-Martínez & Tabatabai, (2000) identificaron valores de 4.9 y 5.7. Además, todos ellos reportaron una alta actividad de alcalina fosfomonoesterasa en suelos básicos con rangos que van desde 7.5 hasta 11.5. En mi estudio, el pH del suelo producto de la dosis media durante el segundo año fue de 7.10 mientras que el pH por efecto de las dosis baja y alta fueron 6.60 y 6.70, respectivamente. Al haber presentado la dosis media un pH más cercano a los suelos alcalinos (>7.5) pudo haber provocado la disminución de la actividad β -Glucosidasa y fosfomonoesterasa comparado a los pH neutros de las dosis baja y alta.

Para la enzima β -1,4-N-acetilglucosaminidasa, Turner, (2010) determinó que la mayor actividad se refleja en suelos con pH entre 4.0 y 5.0 con una media de 4.2. Sin embargo, también observó una tendencia de mayor actividad en suelos con pH < 4.0 y poca actividad en suelos alcalinos. Por otro lado, Puissant et al., (2019) en el experimento a largo plazo (1856- 2015) encontraron que la mayor actividad de la enzima leucina aminopeptidasa se presentó en valor de pH 7 -7.2. La diferencia de rango de pH para una mayor actividad entre las enzimas β -1,4-N-acetilglucosaminidasa y leucina aminopeptidasa podría explicar el no haber encontrado diferencias significativas en la

actividad NAG+LAP al haberlas evaluado en conjunto en mi tesis. Para el tercer año la disminución del pH del suelo hacia rangos ligeramente ácidos (6.04 a 6.67) puede haber contribuido a que las enzimas involucradas en los ciclos del N, C y P presenten similar actividad impidiendo encontrar diferencias significativas comparado al segundo año.

Aunque la dosis de media fue la que ejerció una menor actividad enzimática; esta produjo la mayor presencia de OTUs tanto en el monocultivo como en la rotación maíz-frijol comparada a las dosis baja y media durante el segundo año. Este resultado concuerda con estudios sobre la influencia del pH en las bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito, donde indican que estos grupos tienen las mayores tasas de crecimiento a valores neutros y alcalinos (7-8) (Lin et al., 2021; H. Sun et al., 2022). Estos resultados difieren de lo reportado por S. Liu et al., (2022) quienes encontraron mayor riqueza de UTOs de BON con tasas de aplicación más altas de fertilizantes nitrogenados (336 kg N ha^{-1}) en comparación con tasas menores (168 kg N ha^{-1}). Si embargo; otros estudios como el realizado por Han et al., (2018), evaluando índices de riqueza (ACE y Chao1), determinaron que la especie *Nitrobacter* no experimentó cambios significativos dentro de su estructura debido al uso de fertilizantes químicos u orgánicos solos o combinados. De igual manera en las BOA el mayor número de UTOs fue encontrado el tratamiento de dosis media, aunque en el monocultivo la dosis media y alta presentaron igual cantidad de UTOs. Nuestros resultados tienen relación con estudios realizados por Song et al., (2007) en suelos rojos en China evaluando el efecto de 19 años de rotación de cultivos (soya-maíz-maíz) con tipos de fertilización (orgánico; químico y combinación de ambos). Estos autores reportaron cambios en la comunidad de BOA debido a la mezcla de fertilizantes y la rotación de cultivos, aunque el tiempo de evaluación del estudio fue 19 años, mucho mayor que los 3 años de evaluación de mi investigación.

Asimismo; Ouyang et al., (2018) en un metaanálisis de 47 estudios de campo evaluaron tres regímenes de fertilización nitrogenada (<100 ; $100-200$ y > 200 Kg N ha⁻¹ año⁻¹) encontraron que las tasas de fertilización menores a 100 kg N ha⁻¹ año⁻¹ no ejercieron un cambio significativo en la abundancia de BOA, lo cual concuerda con nuestro resultado al encontrar una mayor presencia de UTOs producto de la dosis media. En general estos resultados muestran que el pH del suelo cumple un rol importante en la biogeoquímica del suelo; sin embargo, al presentar las enzimas una mayor actividad a pH ácidos y siendo estos rangos menos propicios para el crecimiento del grupo de bacterias estudiadas se vuelve importante poder identificar y cuantificar que especies de microorganismos adicionales a los estudiados también intervienen en el reciclaje del N, C y P.

Por último, el N total, C no fueron afectadas por las dosis de fertilizantes. Solo el P modificó significativamente su concentración en el suelo confirmando que el P en suelos tropicales puede llegar a ser un factor limitante en la producción agrícola (Tiessen, 2015; Roy et al., 2016). Adicionalmente, se observó que las BOA tuvieron un menor porcentaje de UTOs comunes que las BON, así como una menor presencia en ambos sistemas de siembra (Fig. 4.19). Esto podría estar asociado con la aplicación de P, ya que se ha demostrado que la adición de P fomenta un ambiente desfavorable para las BOA (H. Xiao et al., 2021; Ning et al., 2021).

5.2 N+P y su efecto en la biogeoquímica del suelo.

Otro factor que pudo influir en los resultados son las dosis de fertilizantes aplicadas. Estas dosis en promedio fueron menores a las reportadas en otras investigaciones pudiendo provocar que no exista diferencias significativas en la actividad enzimática del N, C y P al tercer año. Sin embargo, si se observó una mayor actividad (no significativa) en la β -glucosidasa y fosfomonoesterasa al tercer año producto de las dosis baja y alta

comparado con la actividad NAG+LAP. Los resultados concuerdan con Cenini et al., (2016) y Jian et al., (2016) quienes reportaron que la fertilización nitrogenada a largo plazo tiene un efecto sobre la actividad β -glucosidasa, pero ninguno significativo sobre la actividad β -1,4-N-acetilglucosaminidasa y leucina aminopeptidasa. Jing et al., (2017) tampoco encontraron diferencias en las enzimas β -1,4-N-acetilglucosaminidasa + leucina aminopeptidasa por efecto de la aplicación de N en bosques tropicales y temperados en China. De igual manera; Jian et al., (2016) encontraron un incremento del 11.2% en la enzima β -glucosidasa producto del uso de fertilizantes nitrogenados, mientras que; L. Zhang et al., (2020) hallaron un incremento del 64% en la misma enzima en parcelas fertilizadas respecto al tratamiento control (no fertilizadas) en China. Esto supone que a medida que la relación C:N se altera debido a la aplicación nitrogenada, los microorganismos aumentan la actividad de las enzimas relacionadas con la mineralización de C para suplir la demanda metabólica. Al contrario de lo hallado en mi tesis; Chen et al., (2018) en un metaanálisis sobre el efecto de la adición de N al suelo encontraron que la enzima β -1,4-N-acetilglucosaminidasa aumento entre un $5.5 \pm 4.8\%$, sin embargo, en el mismo estudio se determinó que la enzima leucina aminopeptidasa no respondió a las aplicaciones nitrogenadas. Ullah et al., (2019) en su estudio (2009-2017) de rotación de trigo-maíz (invierno-verano) también encontraron que en el ciclo de maíz la actividad β -1,4-N-acetilglucosaminidasa y fosfatasa incrementaron significativamente respecto al tratamiento control (0 N) como al aplicar dosis bajas y altas de N (364 y $450 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$). Adicionalmente; identificaron que, en la dosis alta, la actividad LAP y BG se afectaron significativamente respecto a la dosis baja. H. Xiao et al., (2021) también probaron el efecto de la fertilización N+P y encontraron que las enzimas β -glucosidasa, β -1,4-N-acetilglucosaminidasa, leucina aminopeptidasa y ácido

fosfatasa (AP) fueron afectados por la fertilización. El no efecto de las dosis de N en las enzimas β -1,4-N-acetilglucosaminidasa y leucina aminopeptidasa en mi tesis pudo estar relacionada al P aplicado en los tratamientos. Existen estudios que sugieren que la aplicación de P puede provocar una disminución en la actividad de β -1,4-N-acetilglucosaminidasa al reducir la necesidad de producir fosfatasas que son ricas en N (C. Wang et al., 2020) o porque las dosis de N aplicadas suplieron la necesidad de este elemento por parte los microorganismos de adquisición de N.

Respecto al efecto de la aplicación de P inorgánico en los sistemas; es conocido que su aplicación disminuye la producción de fosfomonoesterasas en el suelo impidiendo la expresión de los genes PHO. (Nannipieri et al., 2011). Por otra parte; basados en la teoría de distribución de recursos; la fertilización nitrogenada podría inhibir las enzimas encargadas de la degradación de proteínas y quitinas estimulando la actividad fosfatasa mejorando el desarrollo y rendimientos de las plantas en sistemas limitados por P (Jing et al., 2017) en bosques de zonas templadas como tropicales (Nakayama et al., 2021). En este sentido; es conocido que la aplicación de N por tiempo prolongado puede provocar el aumento o disminución de la actividad fosfatasa (W. Sun et al., 2022). Cuando la aplicación de N disminuye la actividad fosfatasa, las plantas y microbiota del suelo desarrollan estrategias para absorber P del suelo (Luo et al., 2022; Mori et al., 2018).

Nuestros resultados concuerdan con las teorías descritas. La mayor actividad de la FME se reflejó con la dosis baja, lo que es un indicativo que la dosis de P no suplió la necesidad de los microorganismos, sin embargo; fue estadísticamente igual a la fertilización alta. La dosis media tuvo la menor actividad de la enzima fosfomonoesterasa. Los análisis químicos en suelo muestran que no hubo diferencias estadísticas en las concentraciones

de N debido a los tratamientos, pero si en P. La diferencia de concentración de P en el suelo entre la dosis baja comparada a las dosis media y alta deberá ser contrastada en los subsiguientes años de evaluación de los sistemas ya que las concentraciones obtenidas estuvieron por debajo del límite de cuantificación (1.87 mg/kg) del equipo con que fueron analizadas. Sin embargo, el haber encontrado la mayor actividad fosfomonoesterasa en la dosis baja ($10 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) puede ser un indicativo que no fue lo suficientemente alta para inhibir los genes PHO o producir una biomasa con una relación N/P alta que provoque limitación de P en el sistema. En la dosis alta la concentración del P en suelo disminuyó 1.7 y 1.9 veces en el monocultivo y la rotación maíz-frijol, respectivamente. Esto puede deberse a un mayor requerimiento por parte del cultivo al producir una mayor biomasa por efecto de las dosis de N más altas. A la vez, la alta dosis de N ($200 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) puede haber provocado la exudación de carboxilatos vía sistema radicular permitiendo la formación de asociaciones con micorrizas que favorecen la mineralización del P y aparición de organismos solubilizadores de P (Luo et al., 2022) para producir fosfatasa. Además, el maíz es conocido por ser una planta fácilmente colonizada por micorrizas arbusculares y por lo tanto se ha encontrado una alta actividad de alcalinas y ácidos fosfatasas que contribuyen a una mayor disponibilidad de P para la planta (McGonigle et al., 1999; Roldán et al., 2005; H. Tian et al., 2013). Los resultados obtenidos tienen relación con lo encontrado por Heitkötter et al., (2017) quienes determinaron que la adición de N contribuye con la actividad enzimática relacionada al ciclo del P principalmente en las capas superficiales del suelo. Esto puede deberse a la cantidad y calidad de residuos de cosecha, de hecho, se estima que un ciclo de maíz puede llegar a producir aproximadamente 4.5 Mg ha^{-1}

conteniendo alrededor de 9 kg P ha^{-1} que son incorporados al suelo por los procesos de descomposición de la materia orgánica (W. Sun et al., 2022).

Al igual que las enzimas la estructura de las comunidades de las bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito no fueron modificadas por las dosis de fertilizantes utilizadas. Lo hallado difiere de Liu et al., (2018) y Avrahami et al., (2003) quienes identificaron diferencias entre grupos de BOA al evaluar el efecto de la fertilización nitrogenada de dos ratios distintos por más de 40 años (168 y 336 Kg N ha^{-1}) en cultivos de maíz cero labranzas en época de verano como en ensayos de incubación de suelo con diferentes ratios de fertilizantes. Inclusive; Ma et al., (2017) determinaron que las BOA son afectadas en periodos cortos de tiempo (2-6 meses) por la fertilización a base N como por su fuente (urea, sulfato y nitro de amonio). Para las BON, Han et al., (2018) encontraron que la fertilización (orgánica, química y combinada) por largos periodos inclusive puede llegar producir cambios dentro de sus comunidades provocando la separación de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira*. De igual manera; Ouyang & Norton, (2020) encontraron que las BOA y las BON del género *Nitrospira* modificaron su comunidad debido a la aplicación de sulfato de amonio respecto al control (0 N) y compost durante de 4 años de aplicaciones consecutivas ($100\text{-}200 \text{ kg N ha}^{-1}$). Finalmente; Z. Zhou et al., (2017) realizaron un metaanálisis usando 454 experimentos de aplicación de N en diferentes microclimas (templados, tropicales, subtropicales, boreales, desérticos y praderas) encontrando que a dosis mayores de $200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ se producen cambios significativos en las relaciones de biomasa microbiana del C y N como de hongos y bacterias (gran + y gran -)

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con Liu et al., (2022) y Segal et al., (2017) para el grupo de UTOs de las BON y BOA quienes encontraron que no hubo

diferenciación entre los UTOs producto de la aplicación de los regímenes de fertilización nitrogenada descritos arriba (168 y 336 Kg N ha⁻¹) como el efecto de arar o no el suelo con aplicaciones de 0, 40, 80, 120, and 160 kg ha⁻¹ año⁻¹; respectivamente. En conclusión, la aplicación de fertilizantes puede tener efectos sobre la microbiota del suelo, especialmente en grupos bacterianos relacionados con la nitrificación. Sin embargo, en nuestro estudio, no se observaron cambios significativos en la estructura de las comunidades de BOA y BON en respuesta a los tratamientos aplicados. Estos resultados sugieren que la dosis de nitrógeno y fósforo utilizada en el estudio puede no ser suficiente para producir cambios significativos en la composición bacteriana en el corto plazo. Sin embargo, es importante seguir monitoreando la evolución de la microbiota a lo largo del tiempo para comprender mejor el efecto acumulativo de la fertilización en el suelo y sus implicaciones en los ciclos biogeoquímicos. Especialmente en climas tropicales donde es posible realizar al menos dos ciclos de maíz por año debido a las condiciones climáticas donde las temperaturas durante los 12 meses del año no alcanzan valores mínimos que puedan disminuir la actividad bacteriana en el suelo.

5.3 Monocultivo y Rotación maíz-frijol: efecto en la biogeoquímica del suelo.

La rotación de cultivos puede ser evaluada mediante la actividad enzimática del suelo (Acosta-Martinez et al., 2018). Además, es una práctica de manejo que logra influir en cómo se estructuran las comunidades microbianas (P. Zhang et al., 2019). En mi estudio no se detectó diferencias estadísticas en las enzimas por efecto de la rotación maíz-frijol y el monocultivo al tercer año; sin embargo, se pudo observar una mayor actividad (no significativa) en el monocultivo. También, la estructura de comunidades de los UTOs pertenecientes a BOA y BON fueron modificadas entre los dos sistemas de siembra evaluados. Para ambas variables los resultados concuerdan y difieren con otros

investigadores. Por ejemplo, para el caso de las enzimas, Sun et al., (2022) determinaron que la actividad FME no fue afectada por la rotación maíz-soya en ensayo a largo plazo (36 años), producto de prácticas de manejo de rotación de cultivos y la fertilización con N en el ciclo de P en el cinturón maicero de Estados Unidos. Investigadores como Ekenler & Tabatabai, (2002) determinaron que la actividad β -glucosidasa fue afectada significativamente por un sistema de rotación maíz-avena-prados después de 4 años con dosis de aplicación de 180 kg N ha^{-1} , a pesar de esto; cuando se evaluaron rotaciones maíz-soya después de ciclos continuos de soya-soya o maíz-maíz fue cuando se detectó la más baja actividad de BG en los suelos. Esto podría indicar que a medida que se agregan más especies dentro de los ciclos de rotaciones la actividad enzimática del suelo tiende a incrementar con el tiempo.

En el caso del grupo de bacterias, H. He et al., (2020) en investigación a lo largo del Delta de las riberas del río Amarillo en China concluyeron que sistemas de rotación como maíz-trigo, soya-maíz, frutas-vegetales logran ejercer cambios significativos en las poblaciones de las BOA. En la misma línea; Song et al., (2007) encontraron efectos similares sobre el mismo grupo de bacterias en cultivos intercalados como trigo, maíz y haba respecto a sus respectivos monocultivos. Por otro lado; otros tipos de manejo de cultivo como arar, cultivos de cobertura, formación de camellones, incorporación de hojarasca etc. pueden llegar a modificar las estructuras dentro de las comunidades de BON. Por ejemplo; Han et al., (2017) en su estudio de siete años determinaron que las BON sufren cambios en su estructura producto de rotar arroz-arroz-colza, incorporando los rastrojos al suelo por medio del arado en sistemas fertilizados, siendo inclusive la especie *Nitrospira* más susceptible que la *Nitrobacter*. La intensificación de la siembra de maíz al hacerlo de manera continua debido a las condiciones climáticas (clima

tropical) pudo contribuir a la diferenciación y establecimiento de UTOs diferentes en el monocultivo comparada a la rotación maíz-frijol.

En general, estos resultados proporcionan un valioso aporte al entendimiento de cómo la diversificación de los sistemas de cultivo y el uso de diferentes prácticas de manejo pueden influir en las comunidades microbianas del suelo como en la actividad enzimática del suelo, y cómo estos cambios pueden afectar la salud y productividad de los agroecosistemas. Es importante seguir investigando en esta área para desarrollar prácticas agrícolas más sostenibles y resilientes en un contexto de cambio climático y creciente demanda de alimentos.

5.4 Análisis temporal de la actividad enzimática y los contenidos C, N y P.

Las enzimas β -glucosidasa, β -1,4-N-acetilglucosaminidasa + leucina aminopeptidasa y fosfomonoesterasa son consideradas útiles para explicar procesos biogeoquímicos relacionadas a los ciclos de C, N y P permitiendo evaluar los beneficios de manejos de agroecosistemas (Das & Varma, 2010; Pérez-Guzmán et al., 2021). En mi estudio; el C del suelo en la rotación maíz-frijol y monocultivo influyo directamente en las enzimas β -glucosidasa y fosfomonoesterasa. Esto concuerda con lo reportado por Tischer et al., (2019); quienes determinaron la relevancia del C orgánico para la potencial actividad de las enzimas β -glucosidasa, β -celobiohidrolasa (CBH) y fosfomonoesterasa, en su estudio sobre la intensidad del uso de suelo. En su investigación, recolectaron datos de suelos fertilizados con productos orgánicos ($60 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ estiércol líquido) y fertilizantes químicos ($125 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) cultivados con pastos, leguminosas y hierbas no leguminosas. Cenini et al., (2016), también encontraron resultados similares para la enzima β -glucosidasa al evaluar praderas de pastoreo dominadas por gramíneas en tres fincas de Irlanda del Norte en suelos fertilizados con dosis de 130 Kg N, P, K; 163 kg

N, P, K y 209 kg N, P, K ha⁻¹ año⁻¹. Cenini et al., (2016) en su mismo estudio encontró una relación positiva entre el N con las enzimas relacionadas a este ciclo lo cual difiere de lo encontrado en mi investigación. En general, al haber encontrado una relación positiva entre la enzima β -glucosidasa y fosfomonoesterasa con el contenido de C en el suelo en la rotación maíz-frijol y monocultivo indica la importancia de la descomposición de la materia orgánica y la liberación de nutrientes como el P orgánico y la mineralización de compuestos fosfatados, coincidiendo por lo indicado por Hou et al., (2015) quienes mencionan que para la producción y liberación de esta enzima es necesario tener C disponible en el suelo para su consumo.

6 CONCLUSIÓN

Los resultados contradijeron parcialmente la hipótesis planteada. La biogeoquímica del suelo no fue modificada significativamente en la rotación maíz-frijol como en el monocultivo debido a la aplicación constante de N+ P durante el tiempo de evaluación, inclusive después de haber realizado dos ciclos de maíz por año en el monocultivo en comparación a zonas de clima templado. Sólo la concentración de P en el suelo fue afectada por las dosis de fertilizantes aplicados. Esto confirma que el P puede llegar a ser un nutriente limitante para la planta en suelos tropicales; por lo que, se recomienda evaluar una dosis “óptima” de fósforo para el cultivo de maíz sin llegar a disminuir o inhibir la actividad enzimática fosfomonoesterasa que contribuye a su disponibilidad en el suelo. Además, conforme se continúen las aplicaciones de fertilizante el pH del suelo influirá significativamente en las variables biogeoquímicas.

Adicional, se observó un efecto significativo del sistema empleado en las bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito del suelo ya que dividió a las bacterias estudiadas según rotación maíz-frijol o monocultivo. También se observó que el monocultivo tuvo un mayor impacto en la actividad enzimática respecto a la rotación maíz-frijol. Por otro lado, se recomienda tomar muestras para evaluar las variables biogeoquímicas cada vez que haya la transición de un ciclo de cultivo a otro (época lluviosa y seca) para corroborar si el efecto observado está dado por los sistemas exclusivamente o hay un mayor peso del componente ambiental o es producto de la combinación de ambos. Adicionalmente, también se podrá evaluar el efecto inmediato de rotar maíz-frijol por ciclo y no acumulativo como se hizo en mi estudio.

Aunque no se detectó diferencias significativas en la estructura de las bacterias por efecto de las dosis de N+P se pudo observar una mayor presencia de bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito producto de la dosis media comparado a las dosis baja y alta; sin embargo, esto no significó una mayor actividad enzimática β -1,4-N-acetyl-glucosaminidasa + Leucina aminopeptidasa. Esto podría confirmar que la actividad enzimática del N del suelo no está estrictamente relacionada al grupo de bacterias evaluadas como tampoco a una mayor presencia en suelo. La concentración de N en el suelo tampoco se vio afectada significativamente en el suelo por lo que la mineralización neta del N (balance entre N mineralizado y N inmovilizado) fue igual para las tres dosis aplicadas. Esto podría indicar que con las dosis aplicadas se logra mantener un equilibrio en la biogeoquímica del suelo por lo que se recomienda evaluar el sistema al menos por 5 años más y observar si los resultados se mantienen al tener una exposición más prolongada e intensiva con los fertilizantes y como esto afecta a la producción.

En general, el no haber encontrado cambios significativos después de tres años de evaluación pudo deberse a que los sistemas pueden ser considerados “jóvenes” y necesitan más tiempo para observar un efecto acumulativo a la exposición del fertilizante nitrogenado y fosfatado. Si los resultados son consistentes en el tiempo se podrá concluir que los monocultivos no perjudican la biogeoquímica del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abán, C. L., Pérez Brandan, C., Verdenelli, R., Huidobro, J., Meriles, J. M., & Vargas Gil, S. (2021). Changes in microbial and physicochemical properties under cover crop inclusion in a degraded common bean monoculture system. *European Journal of Soil Biology*, 107(November). <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103365>
- Acosta-Martinez, V., Cano, A., & Johnson, J. (2018). Simultaneous determination of multiple soil enzyme activities for soil health-biogeochemical indices. *Applied Soil Ecology*, 126, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.11.024>
- Acosta-Martínez, V., & Tabatabai, M. A. (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 31(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/S003740050628/METRICS>
- Acosta-Martínez, V., & Tabatabai, M. A. (2015). Phosphorus cycle enzymes. *Methods of Soil Enzymology*, 79415(9), 161–183. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c8>
- Amundson, R. (2022). Soil biogeochemistry and the global agricultural footprint. *Soil Security*, 6, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.soisec.2021.100022>
- Anderson, T.-H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Ecosystems and Environment*, 98, 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00088-4)
- Attard, E., Poly, F., Commeaux, C., Laurent, F., Terada, A., Smets, B. F., Recous, S., & Roux, X. Le. (2010). Shifts between Nitrospira - and Nitrobacter -like nitrite oxidizers underlie the response of soil potential nitrite oxidation to changes in tillage practices. *Environmental Microbiology*, 12(2), 315–326. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02070.x>
- Avrahami, S., Liesack, W., & Conrad, R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, 5(8), 691–705. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00457.x>
- Barnard, R., Leadley, P. W., & Hungate, B. A. (2005). Global change, nitrification, and denitrification: A review. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1029/2004GB002282>
- Beeckman, F., Motte, H., & Beeckman, T. (2018). Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.014>

- Berhe, A. A., Barnes, R. T., Six, J., & Marín-Spiotta, E. (2018). Role of Soil Erosion in Biogeochemical Cycling of Essential Elements: Carbon, Nitrogen, and Phosphorus. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 46(March), 521–548. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-082517-010018>
- Bruns, M. A., Stephen, J. R., Kowalchuk, G. A., Prosser, J. I., & Paul, E. A. (1999). Comparative diversity of ammonia oxidizer 16S rRNA gene sequences in native, tilled, and successional soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2994–3000. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.2994-3000.1999>
- Bulluck, L. R., Brosius, M., Evanylo, G. K., & Ristaino, J. B. (2002). Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology*, 19(2), 147–160. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00187-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00187-1)
- Carey, C. J., Dove, N. C., Beman, J. M., Hart, S. C., & Aronson, E. L. (2016). Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing archaea. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 158–166. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2016.05.014>
- Castellazzi, M. S., Wood, G. A., Burgess, P. J., Morris, J., Conrad, K. F., & Perry, J. N. (2008). A systematic representation of crop rotations. *Agricultural Systems*, 97(1–2), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2007.10.006>
- Cenini, V. L., Fornara, D. A., McMullan, G., Ternan, N., Carolan, R., Crawley, M. J., Clément, J. C., & Lavorel, S. (2016). Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 96, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.015>
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils* 2012 48:5, 48(5), 489–499. <https://doi.org/10.1007/S00374-012-0691-4>
- Chen, H., Li, D., Gurmesa, G. A., Yu, G., Li, L., Zhang, W., Fang, H., & Mo, J. (2015). Effects of nitrogen deposition on carbon cycle in terrestrial ecosystems of China: A meta-analysis. *Environmental Pollution*, 206, 352–360. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2015.07.033>
- Chen, H., Li, D., Zhao, J., Xiao, K., & Wang, K. (2018). Effects of nitrogen addition on activities of soil nitrogen acquisition enzymes : A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 252(November 2017), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.032>

- Congreves, K. A., Hayes, A., Verhallen, E. A., & Van Eerd, L. L. (2015). Long-term impact of tillage and crop rotation on soil health at four temperate agroecosystems. *Soil and Tillage Research*, 152, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.still.2015.03.012>
- Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (1995). A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64(3–4), 197–214. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00023-4](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00023-4)
- da Silva, R. M., Milori, D. M. B. P., Ferreira, E. C., Ferreira, E. J., Krug, F. J., & Martin-Neto, L. (2008). Total carbon measurement in whole tropical soil sample. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 63(10), 1221–1224. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.09.003>
- Dar, G. H., Bhat, R. A., Mehmood, M. A., & Hakeem, K. R. (2021). Microbiota and biofertilizers, Vol 2: Ecofriendly tools for reclamation of degraded soil environs. In *Microbiota and Biofertilizers, Vol 2: Ecofriendly Tools for Reclamation of Degraded Soil Environs* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4>
- Das, S. K., & Varma, A. (2010). *Role of Enzymes in Maintaining Soil Health* (Issue September, pp. 25–42). https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_2
- Daughtridge, R. C., Nakayama, Y., & Margenot, A. J. (2021). Sources of abiotic hydrolysis of chromogenic substrates in soil enzyme assays: Storage, termination, and incubation. *Soil Biology and Biochemistry*, 158, 108245. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108245>
- Doane, T. A., & Horwáth, W. R. (2003). Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. *Analytical Letters*, 36(12), 2713–2722. <https://doi.org/10.1081/AL-120024647>
- Doran, J. W., & Safley, M. (1997). Biological indicators of soil health. *Biological Indicators of Soil Health*. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700050038x>
- Dos Santos, D. R., Gatiboni, L. C., & Kaminski, J. (2008). Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. *Ciencia Rural*, 38(2), 576–586. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000200049>
- Dotaniya, M. L., Aparna, K., Dotaniya, C. K., Singh, M., & Regar, K. L. (2018). Role of soil enzymes in sustainable crop production. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00033-5>
- Drinkwater, L. E., Schipanski, M., Snapp, S., & Jackson, L. E. (2017). Ecologically Based Nutrient Management. In *Agricultural Systems: Agroecology and Rural Innovation for*

Development: Second Edition (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802070-8.00007-4>

- Ekenler, M., & Tabatabai, M. A. (2002). β -glucosaminidase activity of soils: Effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. *Biology and Fertility of Soils*, 36(5), 367–376. <https://doi.org/10.1007/S00374-002-0541-X/METRICS>
- Fan, J., McConkey, B. G., St. Luce, M., & Brandt, K. (2020). Rotational benefit of pulse crop with no-till increase over time in a semiarid climate. *European Journal of Agronomy*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126155>
- FAO. (2019). Intercropping, Multicropping, and Rotations. *Sustainable Food and Agriculture*, 243–248. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812134-4.00026-1>
- Farmaha, B. S., Eskridge, K. M., Cassman, K. G., Specht, J. E., Yang, H., & Grassini, P. (2016). Rotation impact on on-farm yield and input-use efficiency in high-yield irrigated maize–soybean systems. *Agronomy Journal*, 108(6), 2313–2321. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.01.0046>
- Fiorini, A., Boselli, R., Maris, S. C., Santelli, S., Ardeni, F., Capra, F., & Tabaglio, V. (2020). May conservation tillage enhance soil C and N accumulation without decreasing yield in intensive irrigated croplands? Results from an eight-year maize monoculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 296, 106926. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2020.106926>
- Frankenberger, W. T., & Johanson, J. B. (1982). Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 433–437. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90101-8)
- Freitag, T. E., Chang, L., Clegg, C. D., & Prosser, J. I. (2005). Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8323–8334. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8323-8334.2005>
- FU, Z. dan, ZHOU, L., CHEN, P., DU, Q., PANG, T., SONG, C., WANG, X. chun, LIU, W. guo, YANG, W. yu, & YONG, T. wen. (2019). Effects of maize-soybean relay intercropping on crop nutrient uptake and soil bacterial community. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(9), 2006–2018. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62114-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62114-8)
- Gałązka, A., Gawryjolek, K., Perzyński, A., Gałązka, R., & Książak, J. (2017). Changes in enzymatic activities and microbial communities in soil under long-term maize monoculture and crop rotation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(1), 39–46. <https://doi.org/10.15244/pjoes/64745>

- Giraldo Mendoza, A. E. (2015). La suficiencia taxonómica como herramienta para el monitoreo de artrópodos epígeos: una primera aproximación en el desierto costero peruano. *Ecología Aplicada*, 14(2), 147–156. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162015000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gougoulas, C., Clark, J. M., & Shaw, L. J. (2014). The role of soil microbes in the global carbon cycle: Tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2362–2371. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6577>
- Goyal, S., Sakamoto, K., Inubushi, K., & Kamewada, K. (2006). Long-term effects of inorganic fertilization and organic amendments on soil organic matter and soil microbial properties in Andisols. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 52(6), 617–625. <https://doi.org/10.1080/03650340601048595>
- Hallama, M., Pekrun, C., Lambers, H., & Kandeler, E. (2018). Hidden miners – the roles of cover crops and soil microorganisms in phosphorus cycling through agroecosystems. *Plant and Soil* 2018 434:1, 434(1), 7–45. <https://doi.org/10.1007/S11104-018-3810-7>
- Han, S., Luo, X., Liao, H., Nie, H., Chen, W., & Huang, Q. (2017). Nitrospira are more sensitive than Nitrobacter to land management in acid, fertilized soils of a rapeseed-rice rotation field trial. *Science of the Total Environment*, 599–600, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.086>
- Han, S., Zeng, L., Luo, X., Xiong, X., Wen, S., Wang, B., Chen, W., & Huang, Q. (2018). Shifts in Nitrobacter- and Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacterial communities under long-term fertilization practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 118–125. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.05.033>
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., & Hawrylak-Nowak, B. (2018). Plant nutrients and abiotic stress tolerance. *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*, 1–590. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x>
- He, H., Miao, Y., Zhang, L., Chen, Y., Gan, Y., Liu, N., Dong, L., Dai, J., & Chen, W. (2020). The Structure and Diversity of Nitrogen Functional Groups from Different Cropping Systems in Yellow River Delta. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 424, 8(3), 424. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8030424>

- Heil, J., Vereecken, H., & Brüggemann, N. (2016). A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. *European Journal of Soil Science*, 67(1), 23–39. <https://doi.org/10.1111/ejss.12306>
- Heitkötter, J., Niebuhr, J., Heinze, S., & Marschner, B. (2017). Patterns of nitrogen and citric acid induced changes in C-turnover and enzyme activities are different in topsoil and subsoils of a sandy Cambisol. *Geoderma*, 292, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.01.017>
- Helfenstein, J., Tamburini, F., von Sperber, C., Massey, M. S., Pistocchi, C., Chadwick, O. A., Vitousek, P. M., Kretschmar, R., & Frossard, E. (2018). Combining spectroscopic and isotopic techniques gives a dynamic view of phosphorus cycling in soil. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05731-2>
- Hou, E., Chen, C., Luo, Y., Zhou, G., Kuang, Y., Zhang, Y., Heenan, M., Lu, X., & Wen, D. (2018). Effects of climate on soil phosphorus cycle and availability in natural terrestrial ecosystems. In *Global Change Biology* (Vol. 24, Issue 8). <https://doi.org/10.1111/gcb.14093>
- Hou, E., Chen, C., Wen, D., & Liu, X. (2015). Phosphatase activity in relation to key litter and soil properties in mature subtropical forests in China. *Science of the Total Environment*, 515–516, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.044>
- Hu, H. W., & He, J. Z. (2017). Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments*, 17(12), 2709–2717. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1851-9>
- Ibarra, R. E., Chávez, E. F., Pico, J. T., Subía, C. R., & Margenot, A. J. (2021). Soil nitrogen cycling under contrasting management systems in Amazon Coffea canephora agroecosystems. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1002/saj2.20255>.This
- INOCAR. (2022). *Acumulado mensual de precipitaciones por estación*. <https://www.inocar.mil.ec/web/index.php/precipitacion-por-estacion>
- Isbell, F., Adler, P. R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., Kremen, C., Letourneau, D. K., Liebman, M., Polley, H. W., Quijas, S., & Scherer-Lorenzen, M. (2017). Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *Journal of Ecology*, 105(4), 871–879. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12789>
- Jangid, K., Williams, M. A., Franzluebbers, A. J., Sanderlin, J. S., Reeves, J. H., Jenkins, M. B., Endale, D. M., Coleman, D. C., & Whitman, W. B. (2008). Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in

- agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2843–2853. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.030>
- Janzen, H. H. (2004). Carbon cycling in earth systems - A soil science perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 104(3), 399–417. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.01.040>
- Jian, S., Li, J., Chen, J., Wang, G., Mayes, M. A., Dzantor, K. E., Hui, D., & Luo, Y. (2016a). Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 101, 32–43.
- Jian, S., Li, J., Chen, J., Wang, G., Mayes, M. A., Dzantor, K. E., Hui, D., & Luo, Y. (2016b). Soil extracellular enzyme activities, soil carbon and nitrogen storage under nitrogen fertilization: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 101, 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2016.07.003>
- Jing, X., Chen, X., Tang, M., Ding, Z., Jiang, L., Li, P., Ma, S., Tian, D., Xu, L., Zhu, J., Ji, C., Shen, H., Zheng, C., Fang, J., & Zhu, B. (2017). Nitrogen deposition has minor effect on soil extracellular enzyme activities in six Chinese forests. *Science of the Total Environment*, 607–608, 806–815. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.060>
- Kučerík, J., Tokarski, D., Demyan, M. S., Merbach, I., & Siewert, C. (2018). Linking soil organic matter thermal stability with contents of clay, bound water, organic carbon and nitrogen. *Geoderma*, 316, 38–46. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2017.12.001>
- Kudeyarov, V. N. (2019). Soil-Biogeochemical Aspects of Arable Farming in the Russian Federation. *Eurasian Soil Science*, 52(1), 94–104. <https://doi.org/10.1134/S1064229319010095>
- Lagomarsino, A., Moscatelli, M. C., Di Tizio, A., Mancinelli, R., Grego, S., & Marinari, S. (2009). Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. *Ecological Indicators*, 9(3), 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.07.003>
- Lal, R. (2003). Cropping Systems and Soil Quality. *Journal of Crop Production*, 8, 33. https://doi.org/10.1300/J144v08n01_03
- Lal, R. (2004). Agricultural activities and the global carbon cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 70(2), 103–116. <https://doi.org/10.1023/B:FRES.0000048480.24274.0f>
- Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L., Harpole, W. S., Hobbie, S. E., Hofmockel, K. S., Knops, J. M. H., McCulley, R. L., Pierre, K. La, Risch, A. C., Seabloom, E. W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C. J., & Fierer, N. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in

grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967–10972. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1508382112>

- Li, C., Wade, J., & Margenot, A. J. (2021). Modified universal buffer does not necessarily maintain soil enzyme assay pH. *Biology and Fertility of Soils*, 57(6), 869–872. <https://doi.org/10.1007/s00374-021-01570-4>
- Li, Z., Zeng, Z., Tian, D., Wang, J., Fu, Z., Zhang, F., Zhang, R., Chen, W., Luo, Y., & Niu, S. (2020). Global patterns and controlling factors of soil nitrification rate. *Global Change Biology*, 26(7), 4147–4157. <https://doi.org/10.1111/gcb.15119>
- Lin, Y., Hu, H. W., Ye, G., Fan, J., Ding, W., He, Z. Y., Zheng, Y., & He, J. Z. (2021). Ammonia-oxidizing bacteria play an important role in nitrification of acidic soils: A meta-analysis. *Geoderma*, 404(August), 115395. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115395>
- Liu, S., Coyne, M., Grove, J., & Flythe, M. D. (2022). NitrNitrite Oxidizing Bacteria, Nitrobacter and Nitrospira, are Differently Influenced by Season, Fertilizer, and Tillage in Long-Term Maize Cultureite Oxidizer Activity and Community Are More Responsive Than Their Abundance to Ammonium-Based Fertilizer i. *SSRN Electronic Journal*, 177(May), 104530. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4058008>
- Liu, S., Coyne, M. S., Grove, J. H., & Flythe, M. D. (2018). Nitrogen, season, and tillage management influence ammonia oxidizing bacterial communities in long-term maize. *Applied Soil Ecology*, 129, 98–106. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2018.05.002>
- Liu, T., Wu, X., Li, H., Alharbi, H., Wang, J., Dang, P., Chen, X., Kuzyakov, Y., & Yan, W. (2020). Soil organic matter, nitrogen and pH driven change in bacterial community following forest conversion. *Forest Ecology and Management*, 477, 118473. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2020.118473>
- Luo, M., Moorhead, D. L., Ochoa-Hueso, R., Mueller, C. W., Ying, S. C., & Chen, J. (2022). Nitrogen loading enhances phosphorus limitation in terrestrial ecosystems with implications for soil carbon cycling. *Functional Ecology*, 36(11), 2845–2858. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14178>
- Ma, B. L., Zheng, Z. M., Morrison, M. J., & Gregorich, E. G. (2016). Nitrogen and phosphorus nutrition and stoichiometry in the response of maize to various N rates under different rotation systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 104(1), 93–105. <https://doi.org/10.1007/s10705-016-9761-6>
- Ma, Y., Tao, W., Liu, J., Liu, C., Li, J., & Liu, J. (2017). Response of ammonia-oxidizing betaproteobacteria to short-term fertilization in a salt marsh in China. *Journal of Oceanology and Limnology* 2017 36:2, 36(2), 351–361. <https://doi.org/10.1007/S00343-017-6147-9>

- Maccari, M., Simioni Assmann, T., Bernardon, A., Brugnara Soares, A., Franzluebbers, A., de Bortolli, M., Brum de Bortolli, B., & Glienke, C. L. (2021). Relationships between N, P, and K in corn biomass for assessing the carryover effects of winter pasture to corn. *European Journal of Agronomy*, 129, 126317. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2021.126317>
- Mackenzie, F. T., Ver, L. M., & Lerman, A. (2002). Century-scale nitrogen and phosphorus controls of the carbon cycle. *Chemical Geology*, 190(1–4), 13–32. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(02\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(02)00108-0)
- Margenot, A. J., Nakayama, Y., & Parikh, S. J. (2018). Methodological recommendations for optimizing assays of enzyme activities in soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 125(June), 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.11.006>
- Marschner, P., Kandeler, E., & Marschner, B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453–461. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00297-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00297-3)
- Martikainen, P. J. (2022). Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle. *Soil Biology and Biochemistry*, 168(February), 108611. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108611>
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., & Young, D. (1999). Mycorrhizae, crop growth, and crop phosphorus nutrition in maize-soybean rotations given various tillage treatments. *Plant and Soil*, 210(1), 33–42. <https://doi.org/10.1023/A:1004633512450>
- Melero, S., López-Bellido, R. J., López-Bellido, L., Muñoz-Romero, V., Moreno, F., & Murillo, J. M. (2011). Long-term effect of tillage, rotation and nitrogen fertiliser on soil quality in a Mediterranean Vertisol. *Soil and Tillage Research*, 114(2), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.still.2011.04.007>
- Moebius-Clune, B. N., Moebius-Clune, D. J., Gugino, B. K., Idowu, O. J., Schindelbeck, R. R., Ristow, A. J., van Es, H. M., Thies, J. E., Shayler, H. A., McBride, M. B., Wolfe, D. W., & Abawi, G. S. (2016). Comprehensive Assessment of Soil Health – The Cornell Framework Manual, Edition 3.1. In *Cornell University, Geneva, NY*.
- Mori, T., Imai, N., Yokoyama, D., & Kitayama, K. (2018). Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on the ratio of activities of carbon-acquiring to nitrogen-acquiring enzymes in a primary lowland tropical rainforest in Borneo, Malaysia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(5), 554–557. <https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1498286>
- Nakayama, Y., Wade, J., & Margenot, A. J. (2021). Does soil phosphomonoesterase activity reflect phosphorus pools estimated by Hedley phosphorus fractionation? *Geoderma*, 401, 115279. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2021.115279>

- Nannipieri, P., & Eldor, P. (2009). The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2357–2369. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.013>
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). *Phosphorus in Action*. 26, 215–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Nicolaisen, M. H., & Ramsing, N. B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 50(2), 189–203. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00026-X)
- Nie, Y., Wang, M., Zhang, W., Ni, Z., Hashidoko, Y., & Shen, W. (2018). Ammonium nitrogen content is a dominant predictor of bacterial community composition in an acidic forest soil with exogenous nitrogen enrichment. *Science of the Total Environment*, 624, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.142>
- Ning, J., Arai, Y., Shen, J., Wang, R., & Ai, S. (2021). Effects of Phosphorus on Nitrification Process in a Fertile Soil Amended with Urea. *Agriculture 2021*, Vol. 11, Page 523, 11(6), 523. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11060523>
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J. E., Catterou, M., Dubois, F., & Tetu, T. (2016). Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Applied Soil Ecology*, 108, 147–155. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2016.08.004>
- Olander, L. P., & Vitousek, P. M. (2000). Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry*, 49(2), 175–190. <https://doi.org/10.1023/A:1006316117817>
- Ollivier, J., Töwe, S., Bannert, A., Hai, B., Kastl, E.-M., Meyer, A., Su, M. X., & Kleineidam, Kristina Schlöter, M. (2011). Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiol Ecol*, 78(1), 3–16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01165.x>
- Osterholz, W. R., Liebman, M., & Castellano, M. J. (2018). Can soil nitrogen dynamics explain the yield benefit of crop diversification? *Field Crops Research*, 219, 33–42. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2018.01.026>
- Ouyang, Y., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2018). Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: A meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 127, 71–78. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.08.024>

- Ouyang, Y., & Norton, J. M. (2020). Nitrite Oxidizer Activity and Community Are More Responsive Than Their Abundance to Ammonium-Based Fertilizer in an Agricultural Soil. *Frontiers in Microbiology*, 11(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01736>
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. T., & Minz, D. (2001). Influence of Effluent Irrigation on Community Composition and Function of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3426–3433. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3426-3433.2001>
- Paz-Ares, J., Puga, M. I., Rojas-Triana, M., Martinez-Hevia, I., Diaz, S., Poza-Carrión, C., Miñambres, M., & Leyva, A. (2022). Plant adaptation to low phosphorus availability: Core signaling, crosstalks, and applied implications. *Molecular Plant*, 15(1), 104–124. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2021.12.005>
- Peng, Y., & Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0534-z>
- Pérez-Guzmán, L., Phillips, L. A., Seuradge, B. J., Agomoh, I., Drury, C. F., & Acosta-Martínez, V. (2021). An evaluation of biological soil health indicators in four long-term continuous agroecosystems in Canada. *Agrosystems, Geosciences & Environment*, 4(2), e20164. <https://doi.org/10.1002/AGG2.20164>
- Persson, T., Rudebeck, A., Jussy, J. H., Colin-Belgrand, M., Priemé, A., Dambrine, E., Karlsson, P. S., & Sjöberg, R. M. (2000). *Soil Nitrogen Turnover — Mineralisation, Nitrification and Denitrification in European Forest Soils*. 142, 297–311. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57219-7_14
- Pervaiz, Z. H., Iqbal, J., Zhang, Q., Chen, D., Wei, H., & Saleem, M. (2020). Continuous Cropping Alters Multiple Biotic and Abiotic Indicators of Soil Health. *Soil Systems 2020*, Vol. 4, Page 59, 4(4), 59. <https://doi.org/10.3390/SOILSYSTEMS4040059>
- Pittarello, M., Ferro, N. D., Chiarini, F., Morari, F., & Carletti, P. (2021). Influence of Tillage and Crop Rotations in Organic and Conventional Farming Systems on Soil Organic Matter, Bulk Density and Enzymatic Activities in a Short-Term Field Experiment. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 724, 11(4), 724. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11040724>
- Plante, A. F. (2006). Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047514-1.50019-6>
- Podani, J. (2021). The wonder of the Jaccard coefficient: From alpine floras to bipartite networks. *Flora Mediterranea*, 31(July), 105–123. <https://doi.org/10.7320/FLMEDIT31SI.105>

- Preissel, S., Reckling, M., Schläfke, N., & Zander, P. (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. *Field Crops Research*, 175, 64–79. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2015.01.012>
- Puissant, J., Jones, B., Goodall, T., Mang, D., Bland, A., Gweon, H. S., Malik, A., Jones, D. L., Clark, I. M., Hirsch, P. R., & Griffiths, R. (2019). The pH optimum of soil exoenzymes adapt to long term changes in soil pH. *Soil Biology and Biochemistry*, 138. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2019.107601>
- Real, R. (1999). Tables of significant values of Jaccard's index of similarity. *Miscel·lània Zoològica*, 22(1), 29–40.
- Reckling, M., Hecker, J. M., Bergkvist, G., Watson, C. A., Zander, P., Schläfke, N., Stoddard, F. L., Eory, V., Topp, C. F. E., Maire, J., & Bachinger, J. (2016). A cropping system assessment framework—Evaluating effects of introducing legumes into crop rotations. *European Journal of Agronomy*, 76, 186–197. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2015.11.005>
- Robertson, G. P., & Groffman, P. M. (2007). Soil Microbiology, Biogeochemistry, and Ecology. In *Soil Microbiology, Chemistry, and Ecology* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50017-2>
- Roldán, A., Salinas-García, J. R., Alguacil, M. M., Díaz, E., & Caravaca, F. (2005). *Soil enzyme activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions*. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.12.042>
- Roy, E. D., Richards, P. D., Martinelli, L. A., Coletta, L. Della, Lins, S. R. M., Vazquez, F. F., Willig, E., Spera, S. A., VanWey, L. K., & Porder, S. (2016). The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, 2(5), 2–7. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.43>
- Rütting, T., Aronsson, H., & Delin, S. (2018). Efficient use of nitrogen in agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 2018 110:1, 110(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/S10705-017-9900-8>
- Sahrawat, K. L. (2008). Factors affecting nitrification in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(9–10), 1436–1446. <https://doi.org/10.1080/00103620802004235>
- Sarathchandra, S. U., Ghani, A., Yeates, G. W., Burch, G., & Cox, N. R. (2001). Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7–8), 953–964. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00245-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00245-5)
- Schlöter, M., Dilly, O., & Munch, J. C. (2003). Indicators for evaluating soil quality. *Ecosystems and Environment*, 98, 255–262. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00085-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00085-9)

- Segal, L. M., Miller, D. N., McGhee, R. P., Loecke, T. D., Cook, K. L., Shapiro, C. A., & Drijber, R. A. (2017). Bacterial and archaeal ammonia oxidizers respond differently to long-term tillage and fertilizer management at a continuous maize site. *Soil and Tillage Research*, 168, 110–117. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2016.12.014>
- Serrano, P., & Calderón, M. F. (2016). *Análisis geoespacial del cambio de las zonas de vida de Holdridge en la provincia del Guayas*. January. <https://doi.org/10.18687/lacpei2016.1.1.185>
- Sharma, S. K., Ramesh, A., Sharma, M. P., Joshi, O. P., Govaerts, B., Sttenwerth, K. L., & Karlen, D. L. (2011). *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9513-8>
- Singh, U., Choudhary, A. K., & Sharma, S. (2021). Agricultural practices modulate the bacterial communities, and nitrogen cycling bacterial guild in rhizosphere: field experiment with soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2687–2695. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10893>
- Socolow, R. H. (1999). Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6001–6008. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6001>
- Song, Y. N., Marschner, P., Li, L., Bao, X. G., Sun, J. H., & Zhang, F. S. (2007). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 44(2), 307–314. <https://doi.org/10.1007/S00374-007-0205-Y/FIGURES/3>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.12.021>
- Štursová, M., & Baldrian, P. (2011). Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil*, 338(1–2), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0296-3>
- Subbarao, G. V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K. L., Rao, I. M., Lata, J. C., Kishii, M., & Braun, H. J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science*, 233, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.012>
- Sun, H., Zhang, H., Zhang, F., Yang, H., Lu, J., Ge, S., Ding, J., & Liu, Y. (2022). Response of substrate kinetics and biological mechanisms to various pH constraints for cultured *Nitrobacter* and *Nitrospira* in nitrifying bioreactor. *Journal of Environmental Management*, 307(3), 114499. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114499>

- Sun, W., Villamil, M. B., Behnke, G. D., & Margenot, A. J. (2022). Long-term effects of crop rotation and nitrogen fertilization on phosphorus cycling and balances in loess-derived Mollisols. *Geoderma*, 420, 115829. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2022.115829>
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil Enzymes. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, 5, 775–833. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37>
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tang, Y. ling, Yu, L. ling, Guan, A. mei, Zhou, X. yu, Wang, Z. guo, Gou, Y. gang, & Wang, J. wu. (2017). Soil mineral nitrogen and yield-scaled soil N₂O emissions lowered by reducing nitrogen application and intercropping with soybean for sweet maize production in southern China. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(11), 2586–2596. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61672-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61672-1)
- Tian, H., Drijber, R. A., Zhang, J. L., & Li, X. L. (2013). Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 164, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.09.007>
- Tiessen, H. (2015). Phosphorus dynamics in tropical soils. *Phosphorus: Agriculture and the Environment*, 46, 253–262. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c8>
- Tischer, A., Sehl, L., Meyer, U. N., Kleinebecker, T., Klaus, V., & Hamer, U. (2019). Land-use intensity shapes kinetics of extracellular enzymes in rhizosphere soil of agricultural grassland plant species. *Plant and Soil*, 437(1–2), 215–239. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03970-w>
- Turner, B. L. (2010). Variation in ph optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6485–6493. <https://doi.org/10.1128/AEM.00560-10/ASSET/E27D397F-4FCE-4D16-A494-97FAE14EDC50/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991013960005.JPEG>
- Ullah, S., Ai, C., Huang, S., Zhang, J., Jia, L., Ma, J., Zhou, W., & He, P. (2019a). The responses of extracellular enzyme activities and microbial community composition under nitrogen addition in an upland soil. *PLOS ONE*, 14(9), e0223026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223026>
- Ussiri, D. A. N., & Lal, R. (2017). Carbon Sequestration for Climate Change Mitigation and Adaptation. *Carbon Sequestration for Climate Change Mitigation and Adaptation*, C, 61–76. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53845-7>

- Uzoh, I. M., Igwe, C. A., Okebalama, C. B., & Babalola, O. O. (2019). Legume-maize rotation effect on maize productivity and soil fertility parameters under selected agronomic practices in a sandy loam soil. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43679-5>
- Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., & Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12(6), 399–402. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0)
- Verstraete, W., & Focht, D. D. (1977). *Biochemical Ecology of Nitrification and Denitrification*. 135–214. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8219-9_4
- Vuyyuru, M., Sandhu, H. S., Erickson, J. E., & Ogram, A. V. (2020). Soil chemical and biological fertility, microbial community structure and dynamics in successive and fallow sugarcane planting systems. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 44(6), 768–794. <https://doi.org/10.1080/21683565.2019.1666075>
- Wade, J., Li, C., Vollbracht, K., Hooper, D. G., Wills, S. A., & Margenot, A. J. (2021). Prescribed pH for soil β -glucosidase and phosphomonoesterase do not reflect pH optima. *Geoderma*, 401(January), 115161. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115161>
- Wander, M. (2004). 3 *Soil Organic Matter Fractions and Their Relevance to Soil Function Developing Soil Quality Indicators for Soil Health Assessment in Croplands View project*. <https://doi.org/10.1201/9780203496374.ch3>
- Wang, C., Mori, T., Mao, Q., Zhou, K., Wang, Z., Zhang, Y., Mo, H., Lu, X., & Mo, J. (2020). Long-term phosphorus addition downregulates microbial investments on enzyme productions in a mature tropical forest. *Journal of Soils and Sediments*, 20(2), 921–930. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02450-z>
- Wang, H., Liu, S., Zhang, X., Mao, Q., Li, X., You, Y., Wang, J., Zheng, M., Zhang, W., Lu, X., & Mo, J. (2018). Nitrogen addition reduces soil bacterial richness , while phosphorus addition alters community composition in an old-growth N-rich tropical forest in southern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 127(December 2017), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.022>
- Wang, L., Yuan, X., Liu, C., Li, Z., Chen, F., Li, S., Wu, L., & Liu, Y. (2019). Soil C and N dynamics and hydrological processes in a maize-wheat rotation field subjected to different tillage and straw management practices. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 285, 106616. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2019.106616>
- Wang, Y., Ke, X., Wu, L., & Lu, Y. (2009). Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.007>

- Wang, Y. P., Houlton, B. Z., & Field, C. B. (2007). A model of biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, and phosphorus including symbiotic nitrogen fixation and phosphatase production. *Global Biogeochemical Cycles*, 21(1). <https://doi.org/10.1029/2006GB002797>
- Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X., & Vaí Erie Degrange, &. (2021). *Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of Nitrobacter-like nxrA sequences in soil*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00416.x>
- Xiao, E., Ning, Z., Xiao, T., Sun, W., & Jiang, S. (2021). Soil bacterial community functions and distribution after mining disturbance. *Soil Biology and Biochemistry*, 157, 108232. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108232>
- Xiao, H., Yang, H., Zhao, M., Monaco, T. A., Rong, Y., Huang, D., Song, Q., Zhao, K., & Wang, D. (2021). Soil extracellular enzyme activities and the abundance of nitrogen-cycling functional genes responded more to N addition than P addition in an Inner Mongolian meadow steppe. *Science of The Total Environment*, 759, 143541. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143541>
- Xu, Z., Yu, G., Zhang, X., He, N., Wang, Q., Wang, S., Wang, R., Zhao, N., Jia, Y., & Wang, C. (2017). Soil enzyme activity and stoichiometry in forest ecosystems along the North-South Transect in eastern China (NSTEC). *Soil Biology and Biochemistry*, 104, 152–163. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2016.10.020>
- Zaehle, S., Friend, A. D., Friedlingstein, P., Dentener, F., Peylin, P., & Schulz, M. (2010). Carbon and nitrogen cycle dynamics in the O-CN land surface model: 2. Role of the nitrogen cycle in the historical terrestrial carbon balance. *Global Biogeochemical Cycles*, 24(1), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2009gb003522>
- Zhang, L., Chen, X., Xu, Y., Jin, M., Ye, X., Gao, H., Chu, W., Mao, J., & Thompson, M. L. (2020). Soil labile organic carbon fractions and soil enzyme activities after 10 years of continuous fertilization and wheat residue incorporation. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68163-3>
- Zhang, P., Sun, J., Li, L., Wang, X., Li, X., & Qu, J. (2019). Effect of Soybean and Maize Rotation on Soil Microbial Community Structure. *Agronomy*, 9(2), 42. <https://doi.org/10.3390/agronomy9020042>
- Zhang, X., Tang, Y., Shi, Y., He, N., Wen, X., Yu, Q., Zheng, C., Sun, X., & Qiu, W. (2016). Responses of soil hydrolytic enzymes, ammonia-oxidizing bacteria and archaea to nitrogen applications in a temperate grassland in Inner Mongolia. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep32791>

- Zhang, Y., Li, T., Wu, H., Bei, S., Zhang, J., & Li, X. (2019). Effect of different fertilization practices on soil microbial community in a wheat-maize rotation system. *Sustainability (Switzerland)*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/su11154088>
- Zheng, Z., Simard, R. R., Lafond, J., & Parent, L. E. (2002). Pathways of Soil Phosphorus Transformations after 8 Years of Cultivation under Contrasting Cropping Practices. *Soil Science Society of America Journal*, 66(3), 999–1007. <https://doi.org/10.2136/sssaj2002.9990>
- Zhou, J., Guan, D., Zhou, B., Zhao, B., Ma, M., Qin, J., Jiang, X., Chen, S., Cao, F., Shen, D., & Li, J. (2015). Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in northeast China. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 42–51. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2015.07.005>
- Zhou, Z., Wang, C., Zheng, M., Jiang, L., & Luo, Y. (2017). *Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.015>
- Zungu, N. S., Egbewale, S. O., Olaniran, A. O., Pérez-Fernández, M., & Magadlela, A. (2020). Soil nutrition, microbial composition and associated soil enzyme activities in KwaZulu-Natal grasslands and savannah ecosystems soils. *Applied Soil Ecology*, 155, 103663. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103663>