



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo

Jibda del Pilar Carreño Carreño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2019

Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo

Jibda del Pilar Carreño Carreño

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

Daniel Uribe Vélez Ph.D

Codirector:

Emiliano Barreto Hernández Ph.D

Línea de Investigación: Bioprocesos y bioprospección

Grupo de Investigación: Microbiología agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2019

En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto.

Carl Sagan

Fuera de nuestra capacidad se encuentra el mundo verdadero, vasto y microscópico que nos gobierna.

Agradecimientos

Al profesor Daniel Uribe Vélez, director de mi trabajo de tesis por brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto y de su grupo de investigación, por escuchar siempre sin límite de tiempo y ser guía en las decisiones que solo la experiencia puede resolver.

Al profesor Emiliano Barreto (co-director) por las múltiples reflexiones y procesos de enseñanza.

A Vanessa Otero por ser el norte durante ésta etapa, por brindarme el magnífico ejemplo de un trabajo arduo e impecable.

A la Universidad Nacional por mostrarme el espíritu de la educación de rigor y el valor de la calidad académica. Gracias a esta alma mater por el apoyo a la investigación y la generación de nuevo conocimiento. Agradezco al Instituto de Biotecnología y al grupo de microbiología agrícola por brindarme ilimitadamente sus recursos y permitir el desarrollo de esta investigación.

Agradezco la financiación de este trabajo al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) en conjunto con la Universidad Nacional de Colombia.

Y mi infinito agradecimiento a mi tía y madre por inculcarme que el conocimiento es nuestro mayor tesoro, a la profesora Patricia Cifuentes por su confianza e influencia en los trabajos de investigación que he realizado y a los seres que me brindaron su compañía y paciencia durante todo este tiempo y en las noches de lectura, a Juan, Jonie y mi pequeña Tsuki, a ellos mi corazón.

Resumen

La quema del tamo de arroz a campo abierto es una de las mayores fuentes de contaminación agrícola, es por esto que el retorno de los residuos vegetales al suelo ha sido propuesto como una alternativa de manejo eficiente de los residuos pos-cosecha. Sin embargo, es poco conocido el impacto que tiene sobre los microorganismos edáficos involucrados en la disponibilidad y ciclaje de nutrientes. Por lo anterior, se planteó un experimento en campo para evaluar los cambios generados sobre la comunidad microbiana vinculada al ciclo del nitrógeno por la aplicación de 4 tratamientos diferentes de manejo del tamo de arroz: (Cob+mo) cobertura del terreno con tamo de arroz inoculado con un consorcio microbiano de degradación, (Inc+mo) tamo de arroz inoculado con el consorcio microbiano e incorporado, (Quema) quema del tamo y (Cob) cobertura del terreno con tamo de arroz sin inocular. Se realizaron 4 muestreos de suelo de soporte y suelo rizosférico antes y durante el ciclo de cultivo. Se evaluó la diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana a través del análisis del gen 16S rRNA y se determinó la actividad de las enzimas nitrogenasa, proteasa y ureasa vinculadas con el ingreso de nitrógeno al sistema edáfico. Al final del ciclo de cultivo, los mapas de calor basados en la composición y abundancia de especies, mostraron que las comunidades microbianas de los tratamientos alternos a la quema son más similares entre sí, indicando que la adición de materia orgánica influencia la comunidad edáfica microbiana. La actividad de las enzimas proteasa y ureasa se vio afectada por la aplicación del consorcio de degradación y la forma de retorno del tamo de arroz al suelo respectivamente.

Palabras clave: (Incorporación, cobertura, tamo de arroz, actividad enzimática, 16S rRNA).

Abstract

The return of plant residues to the soil is one of the alternative agricultural practices for the efficient management of post-harvest waste, however, is poor known the impact it has on edaphic microorganisms, responsible for determining soil quality parameters as nutrient availability and cycling. Therefore, a field experiment was proposed to evaluate the changes generated by 4 different treatments of rice straw management on microorganisms related to the nitrogen cycle, consisting of: (Cob+mo) rice straw as a mulch inoculated with a microbial consortium, (Inc+mo) rice straw incorporated and inoculated with the microbial consortium, (Quema) open field burning (Cob) and rice straw as a mulch without inoculation. Four bulk and rhizospheric soil samplings were carried out before and during the cultivation cycle. The diversity, structure and composition of the bacterial community linked to the nitrogen cycle was evaluated through the analysis of the 16S rRNA gene and the activity of nitrogenase, protease and urease enzymes linked to the entry of nitrogen into the soil system was determined. Heat maps based on the composition and abundance of species showed particular groupings of the treatments in each of the sampling stages, evidencing the effect of rice straw management on the structure and composition of the bacterial community over time. The activity of the protease and urease enzymes was affected by the application of the degradation consortium and by the way rice straw is returned to the soil respectively.

Keywords: Incorporation, mulch, rice straw, enzymatic activity, 16S rRNA)

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	1
Introducción	2

Contenido

1. Marco teórico.....	7
1.1 Cultivo de arroz	7
1.2 Tamo de arroz.....	8
1.2.1 Producción y composición del tamo de arroz.....	8
1.2.2 Manejo tradicional del tamo de arroz	10
1.3 Manejos alternos del tamo de arroz en campo	11
1.3.1 Cobertura del terreno con tamo de arroz	12
1.3.2 Incorporación del tamo de arroz	13
1.3.3 Pretratamiento del tamo de arroz.....	13
1.4 Parámetros de calidad del suelo	15
1.5 Microbiología del ciclo del nitrógeno.....	17
1.5.1 Fijación	17
1.5.2 Amonificación	19
1.5.3 Nitrificación	19
1.5.4 Inmovilización.....	21
1.5.5 Denitrificación	21
1.6 Ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz.....	22
1.7 Estudio de las comunidades edáficas.....	25
1.7.1 Actividad enzimática en suelos	26
1.7.2 Nitrogenasa	27
1.7.3 Proteasa	27
1.7.4 Ureasa.....	28
1.7.5 Gen 16S rRNA para el estudio taxonómico de las comunidades de bacterias	29
2. Antecedentes, planteamiento de la investigación y objetivos	33

X Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo

2.1	Antecedentes.....	33
2.2	Planteamiento del problema	35
2.3	Pregunta de investigación.....	35
2.4	Hipótesis.....	35
2.5	Objetivos.....	36
2.5.1	Objetivo general	36
2.5.2	Objetivos específicos.....	36
2.6	Materiales y métodos	37
2.6.1	Área de estudio	37
2.6.2	Material biológico	37
2.7	Diseño experimental	38
2.7.1	Procedimientos de muestreo.....	40
2.7.2	Recolección de muestras de suelo de soporte	41
2.7.3	Recolección de muestras de suelo rizosférico .. ¡Error! Marcador no definido.	
2.8	Ensayos enzimáticos	42
2.8.1	Proteasa.....	42
2.8.2	Ureasa	43
2.8.3	Potencial de la enzima nitrogenasa	43
2.9	Extracción de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación.....	44
2.9.1	Análisis de secuencias del gen 16S rRNA.....	45
2.10	Predicción funcional.....	47
2.11	Herramientas gráficas.....	48
2.12	Análisis estadístico	49
3.	Resultados	50
4.	Conclusiones y recomendaciones	89
4.1	Conclusiones	89
4.2	Recomendaciones	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Principales constituyentes de los residuos vegetales.	9
Figura 2 Representación ciclo del nitrógeno.....	22
Figura 3 Movimiento del nitrógeno en cultivos de arroz... ..	23
Figura 4 Representación estructura gen 16s rRNA.....	30
Figura 5 Diseño experimental.....	39
Figura 6. Cronología del muestreo.	40
Figura 7 Metodología de muestreo por parcela.....	41
Figura 8 Número de secuencias crudas, secuencias filtradas de alta calidad y número de ASVs.....	51
Figura 9 Gráfico de coordenadas principales de escalamiento multidimensional (PCoA) de la diversidad beta basado en las distancias de disimilaridad de índice de Bray Curtis para cada una de las etapas muestreadas.....	54
Figura 10 Distancia de Bray Curtis para todas las muestras de los tratamientos considerando todas las etapas de muestreo	56
Figura 11 Distancia de Bray Curtis colapsando las muestras de los cuatro tratamientos de acuerdo a la etapa de muestreo.....	57
Figura 12 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa inicial.....	58
Figura 13 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa de incorporación	59
Figura 14 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa floración.....	60
Figura 15 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa final.....	61
Figura 16 Dendograma a nivel de filum de la etapa de floración.....	65
Figura 17 Abundancias relativas de las principales familias bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno.....	67
Figura 18 Mapa de calor. Etapa inicial.....	71
Figura 19 Mapa de calor. Etapa incorporación	72
Figura 20 Mapa de calor. Etapa de floración	73
Figura 21 Mapa de calor Etapa final.....	74
Figura 22 Predicción del metabolismo del nitrógeno. Etapa inicial.....	76
Figura 23 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa incorporación.....	77
Figura 24 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa floración.....	78
Figura 25 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa final.....	79

XII Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo

Figura 26 Porcentaje de ASVs predichos asociados con diferentes procesos del ciclo del nitrógeno. Etapa inicial..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 27 Porcentaje de ASVs predichos asociados con diferentes procesos del ciclo del nitrógeno. Etapa incorporación. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 28 Porcentaje de ASVs predichos asociados con diferentes procesos del ciclo del nitrógeno. Etapa de floración. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 29 Porcentaje de ASVs predichos asociados con diferentes procesos del ciclo del nitrógeno. Etapa final. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 30 Actividad de la enzima nitrogenasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo 82

Figura 31 Actividad de la enzima proteasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo 84

Figura 32 Actividad de la enzima ureasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo. 86

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 Principales propiedades biológicas del suelo (Riches et al., 2013)	15
Tabla 2 Resultados Índices de diversidad alfa para todas las etapas de muestreo.	52

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASVs	Amplicon sequence variants
ATP	Adenosin trifosfato
C	Carbono
C:N	Relación carbono nitrógeno
CH ₂	Dióxido de carbono
CH ₄	Metano
C ₂ H ₂	Acetileno
C ₂ H ₄	Etileno
Cm	centímetros
CO	Monóxido de carbono
gr	gramos
h ⁻¹	hectárea
kg	kilogramo
K	Potasio
L	Litro
m	metro
mL	mililitros
mg	miligramos
mM	micromolar
N	Nitrógeno
-NH ₂	grupos amino
NH ₃	amoníaco
NH ₄	amonio
N ₂ O	óxido nitroso
P	fósforo
PAHs	hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCBs	bifenilos policlorados
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCoA	Coordenadas principales de escalamiento multidimensional
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
S	Azufre
SO ₂	dióxido de azufre
v/v	porcentaje de soluto en el volumen total de disolución
Zn	Zing

Introducción

El cultivo de arroz es el principal cultivo destinado a la alimentación humana con una producción mundial de 759,6 millones de toneladas en el año 2017, de las cuales 2.486.723 toneladas fueron producidas en Colombia (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018) (Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz), 2018). Se estima que por cada tonelada de grano de arroz se producen entre 1,35 y 1,5 toneladas de residuos pos-cosecha siendo solo el 20% utilizado para propósitos domésticos o industriales, mientras que la mayor parte del remanente es quemado a campo abierto (Oladosu et al., 2016). Esta práctica, común entre los agricultores permite la remoción rápida de material vegetal y la eliminación de patógenos que atacan el cultivo, sin embargo ha sido asociada a problemas medioambientales serios (Kadam, Forrest, & Jacobson, 2000) (McLaughlin et al., 2016) (Gadde et al., 2009).

La combustión incompleta de los residuos pos-cosecha produce grandes cantidades de gases de efecto invernadero como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) además de la liberación de partículas nocivas para la salud humana y animal (Bond et al., 2013) (Oanh et al., 2011) (Minomo et al., 2011). A nivel del suelo, se ha demostrado la pérdida de nutrientes a través de su volatilización así como la disminución de la actividad y biomasa microbianas (Sharma & Mishra, 2001) (Tung, Cự, & Hai, 2014).

Una opción sustentable de manejo del tamo de arroz sin removerlo del terreno, es usarlo como cobertura o incorporarlo al suelo a través del arado. La cobertura del terreno con tamo de arroz actúa como protección a factores físicos como el viento y la radiación solar, evitando la erosión e incrementando el contenido de carbón orgánico y nitrógeno (Liu et al., 2014) (Wang, et.al., 2015) mientras que por su parte la incorporación del tamo de arroz

se ha asociado con el mantenimiento de la materia orgánica del suelo, el incremento de la disponibilidad de nutrientes y el mejoramiento de las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo (Castillo et al., 2012) (Bisen Neelam, 2017).

Estos manejos alternos son poco frecuentes debido a la naturaleza lignocelulósica del tamo de arroz, por lo cual algunos autores han implementado el uso de microorganismos para intensificar la actividad biológica con el fin de que se lleve a cabo eficazmente la descomposición del material vegetal (Herath et al., 2004) (Lee et al., 2008). Recientes investigaciones en el país, inoculando tamo de arroz con consorcios microbianos en combinación de esquemas de fertilización nitrogenada han resultado en un manejo promisorio los residuos pos-cosecha, logrando mejorar las variables agronómicas del cultivo (Cruz et al., 2017).

El retorno al suelo de tamo de arroz inoculado con microorganismos degradadores debe considerar aspectos relevantes como la disponibilidad y ciclaje de nutrientes, variables que se relacionan con la calidad del suelo y la productividad del cultivo. Uno de los principales factores que afectan la productividad es el contenido de nitrógeno, indispensable para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Liu et al., 2016) cuyo ciclaje biogeoquímico es dependiente de la actividad microbiana (Falkowski et al., 2008). De este modo y aprovechando la alta sensibilidad que tiene el componente biológico del suelo a los cambios (Jangid et al., 2008) (García et al., 2013) se buscó investigar grupos microbianos vinculados al ciclo del nitrógeno para determinar los efectos generados por diferentes manejos del tamo de arroz sobre la disponibilidad de este nutriente, ya sea midiendo la actividad metabólica de la comunidad microbiana o su estructura y diversidad taxonómica (Jangid et al., 2008). Los resultados derivados de este estudio servirán a los agricultores como directrices para el manejo de este residuo vegetal en campo, ayudando al mantenimiento de la calidad del suelo y a la disminución de problemas derivados del manejo común del tamo de arroz.

Las enzimas son ampliamente usadas como indicadores de la actividad biológica del suelo al reflejar la actividad metabólica durante el ciclaje de nutrientes (Karaca et al., 2010)

mientras que la secuenciación de genes marcadores como el 16s rRNA permite conocer con precisión la diversidad taxonómica, composición y estructura de las comunidades microbianas así como también realizar predicciones del perfil funcional de la comunidad microbiana (Langille et al., 2013).

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó el desarrollo de un experimento bajo condiciones de campo para evaluar los cambios que generan diferentes prácticas de manejo del tamo de arroz sobre las comunidades microbianas edáficas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, para lo cual fueron aplicados cuatro tratamientos de manejo que consistieron en (Cob+mo) Tamo de arroz como cobertura del terreno inoculado con un consorcio microbiano de degradación, (Inc+mo) Tamo de arroz incorporado al suelo e inoculado con el consorcio de degradación, (Quema) Quema del tamo de arroz y (Cob) Tamo de arroz como cobertura del terreno sin inoculación; cada tratamiento poseía cuatro réplicas de las cuales se realizaron muestreos de suelo de soporte (SS) y suelo rizosférico (SR) antes y durante un ciclo del cultivo de arroz: sin haber aplicado los tratamientos bajo experimentación (etapa inicial-SS), a los 22 días luego de aplicados los tratamientos (etapa de incorporación-SS), durante la etapa de floración del cultivo – SS y SR y al final de la cosecha-SS. Los cambios generados entre tratamientos fueron valorados mediante la actividad de enzimas involucradas con el proceso de transformación y disponibilidad del nitrógeno (proteasa, ureasa y nitrogenasa) así como por cambios en la comunidad microbiana. Por último, con la información de la composición taxonómica de las comunidades microbianas, se generó una predicción del perfil funcional de la comunidad edáfica de interés, aprovechando la particularidad de taxones bacterianos que participan de la transformación del nitrógeno.

Los resultados obtenidos muestran que la comunidad de microorganismos difiere entre las muestras de suelo rizosférico y el suelo de soporte, indicando que la rizodeposición influencia la estructura y composición microbianas. Basados en mapas de calor generados con la distancia de Bray Curtis para los taxones compartidos entre tratamientos, se identificó que a través del tiempo las comunidades microbianas de los tratamientos alternos a la quema son más similares entre sí, indicando que la adición de materia orgánica es un factor que influye en la estructura y composición de la comunidad microbiana edáfica. Por

su parte, la predicción funcional a partir del gen 16sRNA no arrojó diferencias significativas entre tratamientos, pudiendo no ser un método adecuado para medir cambios en comunidades bacterianas a niveles metabólicos específicos.

En relación a los resultados obtenidos para las enzimas relacionadas con el ciclaje de este nutriente a nivel edáfico, no se vio afectada la actividad de fijación de nitrógeno por los tratamientos aplicados, sin embargo se evidenció una tendencia en función de los tiempos de muestreo, pudiendo corresponder a factores externos dados en cada uno de los momentos de muestreo. En lo que respecta a la enzima proteasa, su actividad fue mayor en los tratamientos inoculados con el consorcio de degradación distinguiéndose del tratamiento de cobertura sin inocular, pudiendo evidenciar la influencia del consorcio de degradación sobre los procesos de mineralización del tamo de arroz. Por último, la actividad de la enzima ureasa en suelo rizosférico fue determinada más por el modo de retorno del material, diferenciándose los tratamientos dejados en cobertura (Cob+mo y Cob) de los que fueron incorporados en un primer momento al suelo (Inc+mo y quema).

1. Marco teórico

1.1 Cultivo de arroz

La planta *Oryza sativa* más conocida como arroz es una gramínea semi-acuática cultivable perteneciente a la familia *Poaceae* tribu *Oryzaceae* distribuida ampliamente en regiones tropicales, subtropicales y templadas de Asia, Norte, Sur América, Europa, Medio Oriente y África (Muthayya et al., 2014). El cultivo de arroz es muy versátil, pudiendo ser sembrado bajo diferentes condiciones, sin embargo guarda una estrecha relación con el agua al permitir el desarrollo de dos o tres cosechas al año en un mismo terreno con sistemas de irrigación o bajo inundación alimentados por agua lluvia, por este motivo cerca del 90% de los cultivos se desarrollan bajo esta condición (International Rice Research Institute, 2013).

El arroz es el segundo cultivo con mayor área sembrada a nivel mundial (Hasanuzzaman et al., 2018) y al ser la base dietaria para más de la mitad de la población mundial se convierte en el de mayor relevancia para la agricultura (Seck et al., 2012) (Awika, 2011). Como consecuencia de la alta demanda, en los últimos años la producción del grano ha incrementado considerablemente, alcanzando para el año 2017 cerca de 160 millones de hectáreas cultivadas y 759,6 millones de toneladas de grano a nivel mundial. (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018)

En Colombia, la superficie sembrada para el año 2018 fue de 500.924 hectáreas aproximadamente con una producción total de 2.486.723 toneladas (Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz), 2018) para cultivos en secano o bajo inundación controlada, es

decir agrupando los sistemas de producción existentes en Colombia, siendo el primero realizado en zonas con poca disponibilidad de agua que dependen casi exclusivamente de las precipitaciones. A nivel departamental Casanare, Tolima, Meta y Huila son los principales productores con un rendimiento promedio de 5,7 toneladas por hectárea (Fedearroz et al., 2017).

1.2 Tamo de arroz

1.2.1 Producción y composición del tamo de arroz

La producción mundial de arroz ha tenido en la última década una tasa de crecimiento promedio anual de 2,5%, generando un incremento en paralelo de los residuos pos-cosecha, los cuales representan cerca del 50% del peso seco de la planta. Se calcula que por cada tonelada de arroz se producen entre 1,35 y 1,5 toneladas de estos residuos (Kadam et al., 2000) (McLaughlin et al., 2016) estimando alrededor de mil millones de toneladas producidas anualmente, no obstante, esta cantidad puede ser mayor debido a que estas mediciones son calculadas en base al área y producción del grano sin mediciones directas del material vegetal (Lal, 2005) (Pratap Bhattacharyya & Barman, 2018).

Todas las partes vegetativas de la planta que quedan sobre el campo luego de la recolección de la cosecha como las láminas y vainas foliares, tallos, cáscaras y panículas son denominadas tamo de arroz (Kausar et al., 2010) (Oladosu et al., 2016). Los principales componentes del tamo de arroz son la lignina (5-24%), la celulosa (32-47%) y la hemicelulosa (19-27%) procedentes de las paredes celulares (Fig. 1) (Belal, 2013) entre otros componentes como galactosa, manosa, pentosas (xilosa y arabinosa), silicio, proteínas y pectina (Sattlewal et al., 2018). La celulosa es el principal componente de las paredes celulares de las plantas y es la encargada de determinar la rigidez al generar una

estructura fibrosa cristalina que además contribuye a la resistencia e insolubilidad de la pared debido a la conformación de unidades lineales de D-glucosa unidas por enlaces β 1,4- glicosídicos (microfibrillas), las cuales a su vez se encuentran unidas por puentes de hidrógeno (Keegstra, 2010). La lignina es después de la celulosa el polímero vegetal más abundante, conformado por tres monómeros fenólicos (p-hidroxifenil, guaicol y el siringil) cuya estructura compleja es la responsable de la rigidez de la planta y la fuerza mecánica a los tejidos (Chen, 2014). La hemicelulosa por su parte, es una molécula no celulósica flexible conformada por una mezcla de polisacáridos dentro de los que se encuentran los xilanos, los mananos, glucanos, galactanos, glucomananos entre otros. La hemicelulosa está unida a las fibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno y a la lignina mediante enlaces covalentes, construyendo juntos una matriz lignocelulítica (Ochoa et al., 2012).

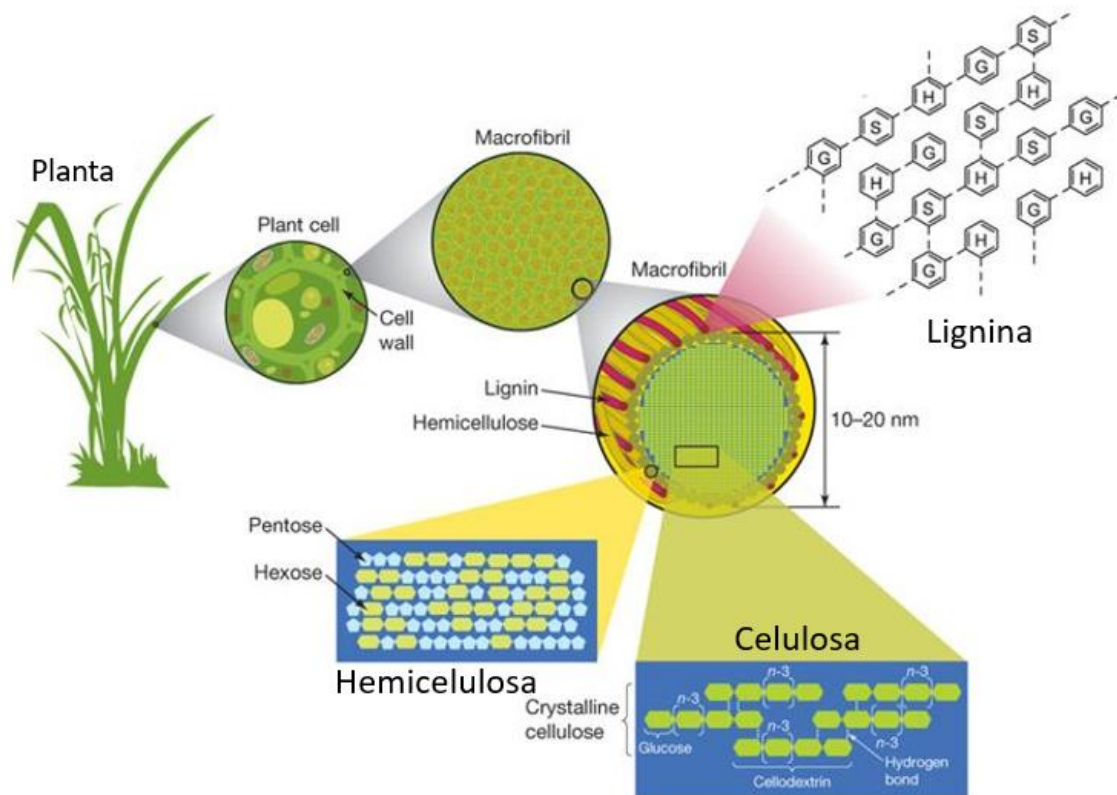


Figura 1 Principales constituyentes de los residuos vegetales. Adaptado de (Rubin, 2008).

Debido a su compleja constitución solo una pequeña parte del tamo de arroz es utilizada para propósitos domésticos o industriales, cerca del 50% del residuo es quemado, mientras que el porcentaje residual es apilado o abandonado en el campo pese a ser una fuente primaria de materia orgánica (Oladosu et al., 2016). Estos residuos pos-cosecha son un recurso renovable con gran potencial como abono orgánico ya que una vez se degradan, los nutrientes contenidos en el material vegetal como el carbono, el nitrógeno, fósforo y potasio son reincorporados al suelo, favoreciendo el crecimiento de las plantas y el mantenimiento de la calidad del suelo (Anguria et al., 2017).

1.2.2 Manejo tradicional del tamo de arroz

La quema del tamo de arroz es la práctica más común de manejo en campo en países en desarrollo al ser la forma más fácil y económica de eliminar grandes volúmenes de residuos pos-cosecha, limpiando el terreno antes de establecer el próximo cultivo para arar y sembrar sin interferencias; esta actividad se da especialmente en cultivos con intervalos cortos entre cosechas, como es el caso del arroz, en donde pueden desarrollarse dos o tres cosechas anuales (Miura & Kanno, 1997) (Bijay-Singh et al., 2008). Además, esta práctica es ampliamente usada por los agricultores como un método de manejo de agentes fitopatógenos a pesar de que la quema deteriora la calidad del suelo (Chen, 2005) (Malhi & Kutcher, 2007). Dentro de los factores que afectan la calidad del suelo se encuentra la pérdida de nutrientes como carbono, nitrógeno y azufre que son emitidos a la atmósfera durante la quema, impactando además la biota edáfica (Doerr & Cerdá, 2005), los procesos de ciclaje de materiales orgánicos y causando depleción de la materia orgánica (Mandal et al., 2004).

Otros problemas derivados de la quema del tamo a campo abierto son la afectación de la calidad del aire, la salud humana y animal, la atmósfera y el clima debido a que la combustión incompleta de los residuos vegetales emite grandes cantidades de material particulado (Bond et al., 2013), gases como el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), el

óxido nitroso (N_2O), monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre (SO_2) (Miura & Kanno, 1997) compuestos volátiles como las dioxinas y furanos (agentes cancerígenos) (Muto, Saitoh, & Takizawa, 1993), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y bifenilos policlorados (PCBs) causantes de problemas respiratorios agudos (Oanh et al., 2011) (Hayashi et al., 2014). Esta práctica además tiene un efecto de calentamiento de la superficie del suelo a una profundidad mayor a 1 cm, produciendo cambios repentinos de temperatura que generan disminuciones del número de microorganismos edáficos, afectando su distribución y actividad metabólica (Tung et al., 2014).

A pesar de que la quema del tamo de arroz puede tener ventajas en términos de operación en campo, representa una fuente de problemas desde la perspectiva medioambiental. Numerosos países han implementado políticas para reducir esta práctica, incluso a nivel Colombia algunas regiones han prohibido la quema de tamo a cielo abierto (Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, Ministerio de ambiente, 2007), haciendo necesaria la búsqueda de alternativas de manejo en campo que promuevan y mantengan la productividad, sin generar efectos adversos sobre el medioambiente, al tiempo de ser viables económicamente para los agricultores.

1.3 Manejos alternos del tamo de arroz en campo

El tamo de arroz ha sido caracterizado como la principal fuente de carbón orgánico en suelos de cultivo de arroz (Ponnanaperuma, 1984) (Eagle et al., 2000) (Anguria et al., 2017) además, considerando su composición se convierte en una fuente importante de nutrientes para el crecimiento de las plantas lo que permite su potencial uso como abono orgánico (C. Liu, et. at., 2014).

En campo, el tamo de arroz puede ser recolectado, apilado o dejado como cobertura para luego ser incorporado al suelo mediante el arado (Sattlewal et al., 2018) (Matsumura et al., 2005). Los principales beneficios relacionados con el retorno de los residuos vegetales al

suelo incluyen el control de la erosión y la temperatura, la retención de la humedad y el mantenimiento de la materia orgánica del suelo (Lal, 2005). Adicionalmente, representa una fuente energética para la biota edáfica, encargada de procesos como la formación y estabilización de agregados del suelo y el ciclaje de nutrientes (Mandal et al., 2004) (Reicosky & Wilts, 2005).

1.3.1 Cobertura del terreno con tamo de arroz

La cobertura del terreno con tamo de arroz consiste en dejar la biomasa vegetal sobre el suelo para protegerlo de factores físicos como el viento, la evaporación y las radiaciones solares (Liu et al., 2014), permitiendo la conservación de la humedad y la reducción de las oscilaciones térmicas, la agregación y la erosión del suelo (Erenstein, 2002) (Acharya et al., 2005). Por otra parte, una vez la cobertura es mineralizada por los microorganismos, los nutrientes contenidos en el material vegetal retornan al suelo, favoreciendo el mantenimiento de las condiciones físico-químicas e incrementando la actividad de la microbiota edáfica al proporcionarle una fuente de alimento fácilmente disponible (K. Kumar & Goh, 1999) (Castillo et al., 2012) (Bisen Neelam, 2017) (Feng & Balkcom, 2017). La liberación lenta del nitrógeno producto de la descomposición de los residuos dejados en cobertura está mejor sincronizada con la toma de este nutriente por parte de la planta en comparación con el nitrógeno inorgánico aplicado como fertilizante, resultando en una eficiente absorción de nitrógeno (Fageria, 2007).

Otro efecto proporcionado por la práctica de cobertura es el control de la incidencia de malezas al impedir su crecimiento por efectos alelopáticos o por sofocamiento, lo que puede evitar el uso de herbicidas (Haizel, 1989) (Bijay-Singh et al., 2008).

1.3.2 Incorporación del tamo de arroz

Aunque no es tan frecuente, algunos agricultores incorporan el tamo de arroz al suelo a través del arado, que es el método mecánico más eficiente para este fin, al romper los residuos vegetales en piezas más pequeñas, lo que genera un menor tiempo de descomposición (Christian & Bacon, 1991). Ésta opción es una de las vías primarias para el mejoramiento de la calidad del suelo al restablecer las propiedades físico-químicas y al incrementar la disponibilidad de nutrientes a través del reciclaje (Castillo et al., 2012) (Bisen Neelam, 2017). También es considerada una estrategia importante para reducir la dependencia de los fertilizantes minerales puesto que incrementa la eficiencia del uso del nitrógeno por la reducción de la tasa de lixiviación (Yang et al., 2018).

Los efectos de esta práctica a corto plazo pueden ser leves y poco perceptibles, sin embargo, investigaciones en periodos de tiempo prolongados con aplicación continua de tamo de arroz denotan un incremento significativo el rendimiento del cultivo así como en los contenidos de nitrógeno y carbono total en arrozales, permitiendo una mejor toma de nutrientes por parte de las plantas (Takahashi, Uenosono, & Ono, 2003). Ha sido documentado que la incorporación del tamo de arroz y su posterior descomposición incrementan la disponibilidad de carbón orgánico, nitrógeno, fósforo, potasio y otros micronutrientes en el suelo, mantienen el nivel de materia orgánica e influyen sobre la estructura y metabolismo de los microorganismos edáficos y las actividades enzimáticas (Wei et al., 2015) (Guo et al., 2016)(Singh et al., 2000).

1.3.3 Pretratamiento del tamo de arroz

La mayoría de cultivadores de arroz no ponen en práctica las opciones de manejo del tamo alternas a la quema debido a la baja tasa de descomposición que posee éste residuo vegetal y a la poca oxigenación del suelo, factores que generan que la descomposición difícilmente sea completada en el periodo de descanso que se establece entre cultivos; por

otra parte el posible re-ingreso de patógenos provenientes de cultivos anteriores y la inmovilización de nutrientes como el nitrato como resultado de la alta relación C:N son otras de las razones para no incorporar los residuos vegetales puesto que, son condiciones no deseables en suelos agrícolas por los posibles efectos negativos sobre el rendimiento del cultivo (Christian & Bacon, 1991) (Mandal et al., 2004). Sin embargo, el efecto de inmovilización es temporal, ya que al morir los microorganismos, se liberará el contenido de nitrógeno y otros compuestos previamente incorporados.

Diversas investigaciones han centrado su atención en la búsqueda de condiciones que permitan reducir los efectos negativos de la incorporación y mejoren la tasa de descomposición del tamo de arroz en campo. Para corregir la proporción C:N se ha probado la aplicación extra de fertilizante nitrogenado luego de incorporar los residuos para no afectar la productividad (Bhattacharyya et al., 2012) (Zhang et al., 2013) (Knoblauch et al., 2014) (Guo et al., 2018), mientras que para acelerar el proceso de descomposición se ha implementado el uso de microorganismos lignocelulolíticos permitiendo mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Qin et al., 2015). Tanto bacterias como hongos están involucrados activamente en el proceso de descomposición de los residuos vegetales (Kumar, Gaiind, & Nain, 2008) (Herath et al., 2004) (Feng & Balkcom, 2017). Estos dos grupos de microorganismos degradadores pueden actuar manera sinérgica, completando el arsenal de enzimas necesarias para transformar los constituyentes recalcitrantes del tamo de arroz (Kumar et al., 2008). Así, la interacción hongo-bacteria resulta beneficiosa para ambas especies. Por su parte los hongos colonizan rápidamente los sustratos sólidos descomponiéndolos aeróbicamente. Uno de los géneros más usados para la degradación de materiales lignocelulolíticos es *Trichoderma* siendo usado en diversas investigaciones para potenciar la degradación de enmiendas orgánicas (Ng, et al., 2016) (Belal, 2013) (Cruz Ramírez et al., 2017), mientras que las bacterias (en su mayoría Gram positivas) han sido señaladas como responsables de la degradación de componentes celulolíticos incorporados al suelo bajo condiciones de inundación (Kimura et al., 2001), destacándose los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Clostridium* (Weber et al., 2001).

Éste tipo de estrategias de manejo usando microorganismos que potencien la degradación de los residuos del cultivo de arroz en campo pueden ser una forma sostenible y efectiva de promoción del reciclaje de nutrientes y del mejoramiento de los parámetros que determinan la calidad del suelo, evitando adicionalmente los efectos negativos de la incorporación y permitiendo la reducción del tiempo de descomposición.

1.4 Parámetros de calidad del suelo

El suelo debe ser contemplado como un sistema dinámico y complejo, compuesto por minerales, agua, gases, materia orgánica y microorganismos bajo la influencia de procesos físicos, químicos y biológicos (Van Es, 2017). Las propiedades físicas hacen referencia a las propiedades como la textura del suelo, la densidad, la agregación, estabilidad, contenido de agua y retención de agua; por su parte las principales propiedades químicas del suelo son la capacidad de intercambio catiónico y el pH y por último las propiedades biológicas que incluyen la materia orgánica, la variedad de organismos que habitan, se desarrollan y crecen en el suelo (macrofauna, mesofauna y microfauna), la tasa de respiración y las actividades enzimáticas (Riches et al., 2013) .

Tabla 1 Principales propiedades biológicas del suelo (Riches et al., 2013)

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL SUELO	
1	Tasa de respiración
2	Carbono orgánico
3	Nitrógeno orgánico
4	Biomasa microbiana
5	Diversidad genética microbiana
6	Diversidad funcional microbiana
7	Materia orgánica
8	Actividades enzimáticas

Los microorganismos son el tipo de organismos más numerosos del suelo y en los cuales se ha centrado el estudio de las propiedades biológicas. La magnitud de las poblaciones microbianas es tal, que se ha reportado que en tan solo un gramo de suelo pueden encontrarse más de 10 billones de microorganismos de miles de especies diferentes (Torsvik et al, 1990). Estas poblaciones a través de sus actividades metabólicas determinan, influyen y mantienen las características edáficas, interviniendo directamente en la continuidad de los ciclos del carbono, nitrógeno, oxígeno y fósforo, así como en la promoción del crecimiento vegetal, la resistencia a enfermedades y la degradación de la materia orgánica (Nannipieri et al., 2003).

Los microorganismos se convierten de ésta manera en la maquinaria central de la fertilidad del suelo siendo los mediadores primarios de la descomposición de la materia orgánica y responsables de la función y sostenibilidad de los ecosistemas terrestres. La microbiota ha ganado auge en los últimos años como potencial indicador de monitoreo de la calidad del suelo debido al alto grado de sensibilidad a los disturbios y la generación de respuestas rápidas a los cambios naturales y antropogénicos (Bending, Putland, & Rayns, 2000)(Filip, 2002). Algunos estudios sugieren que desde el momento en que el sistema suelo es modificado por las actividades humanas, los mayores cambios ocurren en las propiedades biológicas presentes, alterando su diversidad y actividad (García-Orenes et al., 2013).

Con base en lo anterior, las comunidades de microorganismos que habitan los suelos de cultivo de arroz y sus funciones serán modificadas por cualquier disturbio medioambiental que reciba el sistema incluyendo diferentes prácticas agrícolas (fertilización, arado, riego, manejo de los residuos vegetales entre otras) (Luo et al., 2016) (Bending et al., 2000) (Filip, 2002), que se asocian con la productividad del cultivo ya que modulan indirectamente la disponibilidad de nutrientes esenciales para las plantas. En este contexto, nutrientes como el nitrógeno tienen especial interés, pues su ciclaje está condicionado casi exclusivamente por la actividad microbiana (Isobe & Ohte, 2014), lo que convierte a los grupos bacterianos

que intervienen en el ciclo del nitrógeno en indicadores específicos de calidad vinculados fuertemente a la productividad de cultivo.

Son pocos los grupos de microorganismos que han desarrollado mecanismos para la asimilación de las formas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno. En los ecosistemas terrestres, los residuos de las plantas y la fijación biológica de nitrógeno son las dos principales fuentes de entrada de nitrógeno, con una baja contribución proveniente de los desechos animales que son transformados a formas simples; posteriormente los microorganismos desnitrificantes que habitan el suelo se encargan de retornar el nitrógeno a su forma gaseosa para completar el ciclo (Ward & Jensen, 2014). Éste proceso junto con los actores biológicos involucrados se detallan a continuación.

1.5 Microbiología del ciclo del nitrógeno

A pesar de ser el elemento más abundante de la atmósfera terrestre (78% aprox.) y principal reserva para los sistemas biológicos, el nitrógeno en su forma molecular no puede ser asimilado por la mayoría de organismos (incluidas las plantas) a causa de su naturaleza inerte producto del triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno, lo cual hace que el gas dinitrógeno sea bastante estable y evite su reacción con otros elementos (Bothe et al., 2007); para ser usado por las plantas para la síntesis de clorofila, proteínas y ácidos nucleicos requiere una serie de transformaciones previas para cambiar los grados de oxidación del nitrógeno (Thamdrup, 2012). Naturalmente el movimiento de éste elemento a través de la atmósfera, la biósfera y la geosfera es determinado casi completamente por la actividad microbiana y al ser indispensable para la formación de macromoléculas tiene el potencial de estructurar las comunidades edáficas (Bess B Ward & Jensen, 2014). En el ciclo del nitrógeno se identifican las siguientes etapas y actores:

1.5.1 Fijación

El término hace referencia a la transformación del nitrógeno molecular N_2 (forma inorgánica) a amonio (forma orgánica). La fijación biológica del gas dinitrógeno es llevada

a cabo por microorganismos de vida libre y por bacterias y archaeas simbióticas que poseen el complejo enzimático de la proteína dinitrogenasa (Stein & Klotz, 2016), la cual permite a los microorganismos romper los enlaces triples del nitrógeno molecular para liberar los dos átomos de nitrógeno, que luego se combinan con hidrógeno para formar amonio (NH_4) (Berg et al., 2002). Ésta reacción es sensible a la presencia de oxígeno así como altamente demandante en términos de gasto energético para los microorganismos, requiriendo 16 moléculas de ATP por cada molécula fijada de nitrógeno (Berg et al., 2002).

Dentro de los microorganismos fijadores, principalmente se encuentran las cianobacterias acuáticas verde-azuladas que poseen células especializadas para la fijación de nitrógeno conocidas como heterocistos, que permiten tener bajos niveles de oxígeno como consecuencia de las altas tasas de respiración celular (Flores, López-Lozano, & Herrero, 2015). Dentro de este grupo se destacan los géneros *Anabaena* y *Nostoc* (Bothe et al., 2007).

Otros microorganismos de vida libre pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Desulfovibrio* y *Clostridium* también llevan a cabo procesos de fijación de nitrógeno. Por otra parte, microorganismos diazotróficos, pertenecientes a las α -proteobacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y a las β -proteobacterias de los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* se asocian simbióticamente a estructuras nodulares en las raíces de las plantas (Shamseldin, Abdelkhalek, & Sadowsky, 2017), donde a través de la fijación de nitrógeno proporcionan amonio a la planta mientras que ésta les provee carbohidratos. Otros grupos destacados de diazotrofos son los géneros *Frankia* y *Methylomonas* que nodulan las raíces de las plantas y algunos anaerobios quimiorganotrofos de vida libre como *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Chromatium* y *Chlorobium* (Mus et al., 2016). Otros microorganismos como *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Methylobacterium*, *Zymomonas*, *Paenibacillus*, *Heliobacterium* y *Pseudomonas* (Pajares & Bohannan, 2016).

1.5.2 Amonificación

Se refiere a la reacción química en la cual los grupos amino (NH_2) asociados con formas orgánicas de nitrógeno como proteínas, aminoácidos, azúcares aminados y ADN son convertidas por organismos descomponedores como hongos y bacterias en amoniaco (NH_3) o amonio (NH_4^+) (Strock, 2008). Luego estos compuestos proteicos y demás estructuras orgánicas nitrogenadas, que representan cerca del 98% del nitrógeno total del suelo (Schimel & Bennett, 2004) quedan disponibles para que las plantas lo utilicen como nutriente o como sustrato para el proceso de nitrificación. (Bremner, 1955).

La amonificación comprende dos fases, la primera es la depolimerización a través de enzimas proteolíticas (proteasas) que convierten proteínas, ácidos nucleicos y demás compuestos nitrogenados en peptonas y polipéptidos y la segunda fase que corresponde a la desaminación y descarboxilación llevada a cabo por peptidasas que transformarán esos polipéptidos en aminoácidos (Isobe & Ohte, 2014). Los principales géneros asociados con esta fase del ciclo del nitrógeno son *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Clostridium* (Ruda de Schenquer et al., 2004). Así mismo los desechos animales que contienen nitrógeno en forma de urea (orina) o ácido úrico (heces) y otros compuestos orgánicos nitrogenados pueden ser transformados a amonio a través de la acción de la enzima ureasa. Debido a que la mayor cantidad de nitrógeno en el suelo es orgánico, la relación entre el contenido de materia orgánica y nitrógeno total es directa y proporcional (Roberttson & Groffman, 2015).

1.5.3 Nitrificación

Como proceso general define la oxidación del amonio a formas menos reducidas. A partir del amonio se lleva a cabo un proceso secuencial que genera como producto final el ión nitrato. En la primera parte, llevada a cabo en la membrana de las bacterias nitrificantes la enzima amoniaco mono-oxigenasa oxida el amonio produciendo hidroxilamina (NH_2OH), luego las bacterias oxidantes de amonio o nitrificantes, restringidas a unos pocos

géneros dentro de los que destacan *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrosococcus*, *Nitrosphaera* y *Nitrosotalea* oxidan el ión amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) a través de la enzima hidroxilamina oxido-reductasa y posteriormente un segundo grupo de bacterias quimiolitótrofas nitrificantes del género *Nitrobacter* principalmente, lo oxidan a nitrato (NO_3^-) por acción de la enzima nitrito oxidoreductasa (Ward, 2013). Otros géneros de bacterias oxidadoras de nitrito que han sido descritos son *Rhodopseudomonas* y *Thiocapsa*, estrechamente relacionados con el género *Nitrobacter* y *Nitrococcus* respectivamente (Tan, 2000) (Isobe & Ohte, 2014)(American Society of Plant Biologists, 2018) y los géneros *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira* (Pajares & Bohannan, 2016). Estos grupos de bacterias se caracterizan por ser predominantemente autótrofas con una minoría de heterótrofos y archaeas capaces de realizar la nitrificación.

Por otra parte, existe un grupo de bacterias descubiertas hace relativamente poco tiempo, catalogadas como oxidadores completos de amonio, que llevan a cabo toda la reacción hasta la obtención final de nitrato, pertenecientes a un linaje específico del género *Nitrospira* (Daims et al., 2015). Debido a que el nitrato es un anión, es mucho más móvil que el amonio, siendo fácilmente transportado a la zona rizosférica por el agua, sin embargo su carga negativa favorece la lixiviación pudiendo disminuir sus niveles en el suelo (Roberttson & Groffman, 2015). El nitrato es removido por las corrientes de agua, luego se acumula en cuerpos de agua superficial donde genera eutrofización y en depósitos subterráneos contaminándolos (Camargo & Alonso, 2006). Algunas plantas como *Oryza sativa* toman más eficazmente el amonio que el nitrato (Wang, Siddiqi, Ruth, & Glass, 1993). Al tratarse de un proceso oxidativo y tomando en cuenta las características del cultivo de arroz, suele presentarse en las capas superficiales del suelo o en zonas cerca a las raíces (Ying-Hua et al., 2006). En los suelos agrícolas se suele aplicar fertilizante nitrogenado a base de amonio o urea evitando pérdidas por nitrificación.

1.5.4 Inmovilización

Corresponde a la incorporación del nitrógeno mineral por parte de la microflora del suelo para hacerlo parte constitutiva de sus componentes y llevar a cabo sus funciones celulares (Shen, Pruden, & Jenkinson, 1984).

1.5.5 Denitrificación

Es la etapa del ciclo, en la que algunas bacterias, archaeas y hongos toman el ion nitrato y lo convierten en nitrógeno molecular y demás formas gaseosas bajo condiciones estrictas de anaerobiosis, de ésta manera se da la reducción biológica que reintegra nitrógeno a la atmósfera. Estos microorganismos usan el nitrato como un sustituto del oxígeno durante la respiración y lo convierten en diferentes componentes gaseosos de manera secuencial (NO , N_2O y N_2) (Liesack, Schnell, & Revsbech, 2000).

Una amplia variedad de bacterias en el suelo, incluyendo heterótrofas (principalmente), quimio y fotolitótrofas, fijadores de nitrógeno, termófilas y halófilas pueden denitrificar el nitrato al usarlo como aceptor final de electrones en lugar de usar oxígeno durante el proceso de respiración (Robertson & Groffman, 2015). Debido a que el nitrato es un aceptor menos eficiente que el oxígeno, esta reacción la llevan a cabo los microorganismos solo cuando el oxígeno no está disponible en el medio. También se ha reportado que taxones del género *Nitrospira*, conocido por su actividad nitrificante pueden llevarlo a cabo (Shaw et al., 2006). Otros taxones asociados a este proceso son *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Bacillus* y *Paraccocus*. Con este paso se da el cierre del ciclo del nitrógeno.

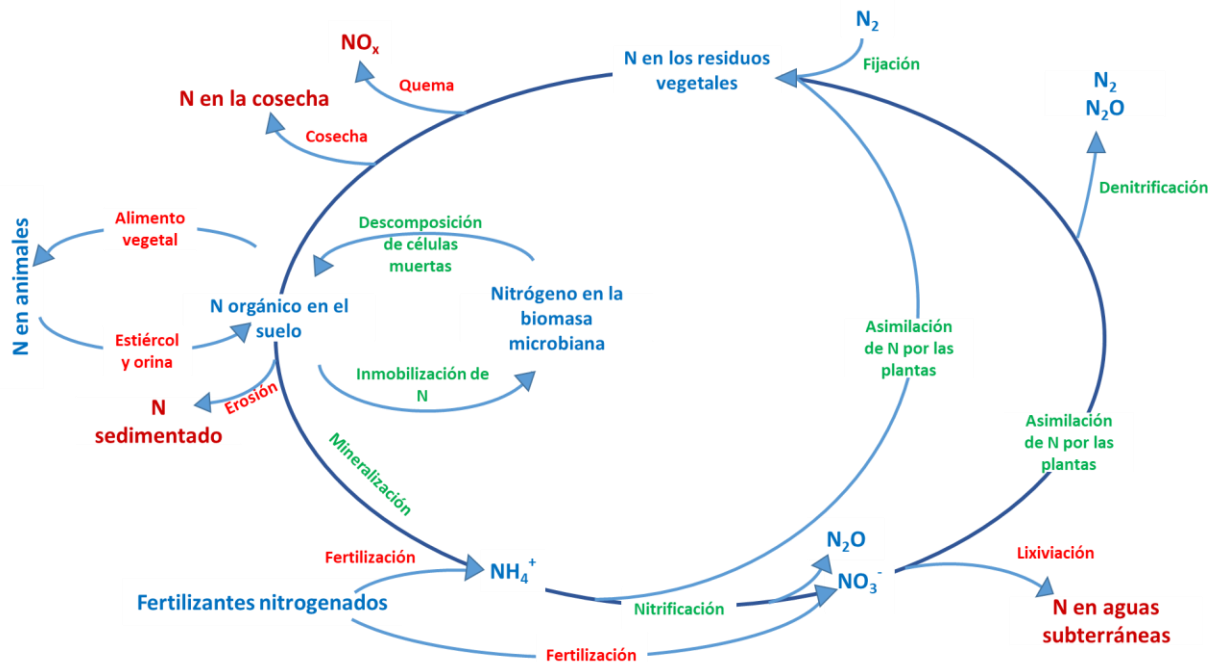


Figura 2 Representación ciclo del nitrógeno. Los procesos mediados por microorganismos dentro del ciclo del nitrógeno son representados por letras verdes. Adaptado de (Robertson & Groffman, 2015)

1.6 Ciclo del nitrógeno en suelos de cultivo de arroz

El suelo de cultivo de arroz es un ecosistema único debido a las etapas de alternancia entre condiciones óxicas y anóxicas que se dan durante la inundación y posterior drenaje del terreno, generando diversos hábitats para los microorganismos de acuerdo a los niveles de oxígeno (Unger, Kennedy, & Muzika, 2009). Es de esperarse que los ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno se vean afectados en sus diferentes fases de forma particular, pues la transformación de este nutriente se basa en los diferentes estados de oxidación. Por ejemplo, la fijación biológica de nitrógeno es favorecida en cultivos de arroz incorporando entre 8 y 30 kg de N por hectárea en un solo ciclo de cultivo (Quesada et al., 1997). Otros autores describen que una capa de agua entre 1 y 15 centímetros favorece

la fijación biológica de N mediada por algas (Reddy, 1982) de las cuales las cianobacterias diazotróficas fotodependientes son las que se asocian en mayor medida con esta actividad (Vaishampayan et al., 2001). A pesar de que el ambiente anóxico puede promover la fijación biológica, la aplicación de fertilizantes inorgánicos amoniacales al cultivo la inhibe, éste efecto es dado por el alto costo energético de la reacción que requiere controlar la actividad de la enzima nitrogenasa bajo concentraciones adecuadas de amonio o nitrato (Kennedy et al., 1994). También se ha demostrado que procesos como la volatilización y la lixiviación de formas nitrogenadas se ven favorecidos con la inundación de los cultivos (Zhou, Nakashimada, & Hosomi, 2009).

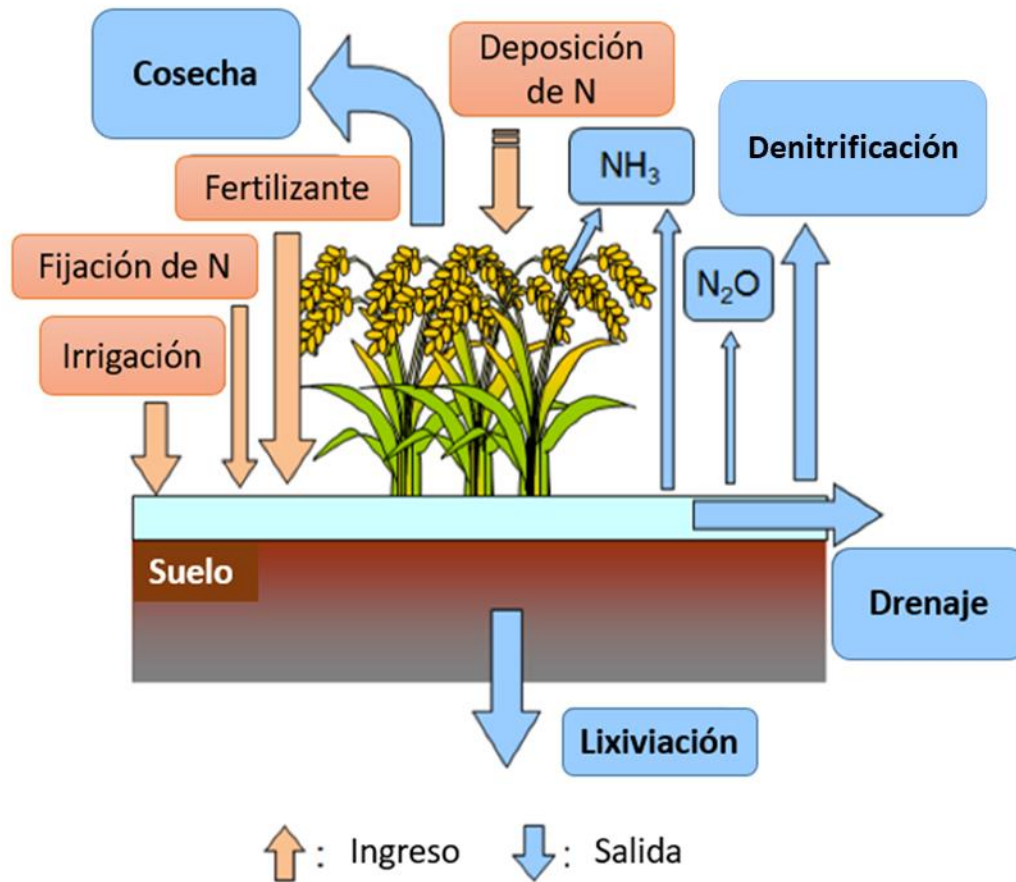


Figura 3 Movimiento del nitrógeno en cultivos de arroz. Modificado de (Takakai et al., 2017).

En el caso de la nitrificación, se observa una menor tasa en suelos saturados o bajo inundación pudiendo ocurrir sólo en el espacio superficial de la capa de agua, donde hay suficiente oxígeno disuelto y en la zona cercana a la rizósfera, donde se difunden bajas cantidades de oxígeno transportadas por la planta a través del aerénquima, lo cual permite el crecimiento de microorganismos nitrificantes aeróbicos (Dandeniya & Thies, 2015), resultando en periodos prolongados con altas concentraciones de amonio luego de la aplicación de fertilizantes inorgánicos; este efecto resulta beneficioso para la absorción de amonio por parte de las plantas de arroz.

La nitrificación y la desnitrificación ocurren simultáneamente en suelos bajo inundación, aunque ocurran en zonas diferentes, ya que el nitrato es el sustrato de la reacción de desnitrificación. La tasa de desnitrificación está influenciada por la concentración de oxígeno, la temperatura, el pH, las poblaciones de microorganismos desnitrificantes y por supuesto por la concentración de nitrato (Reddy, 1982).

Viendo el ciclo del nitrógeno de manera general se evidencia como el flujo del nitrógeno en el suelo depende de las reacciones de óxido reducción que sufren los compuestos nitrogenados realizadas por microorganismos. A pesar de que muchas rutas en el ciclo del nitrógeno fueron descritas hace más de un siglo, aún hay mucho que entender acerca de la microbiología del ciclo, más aún bajo condiciones especiales como es el caso del cultivo de arroz a lo cual se adicionan los efectos que traen las prácticas de manejo de los residuos vegetales sobre este proceso. El estudio de las comunidades microbianas responsables de la continuidad del ciclo y sus interacciones pueden brindar un enfoque de la calidad del suelo basado en el nitrógeno, en otras palabras, un cambio en la comunidad microbiana puede ser usado como indicador de las condiciones que determinan la calidad del suelo y pueden servir de herramienta para la evaluación de los manejos de los residuos pos cosecha. La presente investigación se centra en los procesos de entrada del nitrógeno al sistema suelo: la fijación biológica de nitrógeno y el proceso de amonificación, por los cuales se aseguran existan los niveles requeridos tanto para los microorganismos como

para las plantas. El progreso en esta área de la ciencia ha sido facilitado por los avances tecnológicos, especialmente de la genómica.

1.7 Estudio de las comunidades edáficas

Tradicionalmente, el análisis de las comunidades edáfica se ha realizado a través de técnicas de cultivo, usando gran variedad de medios de cultivo que permitieran la recuperación de diversas poblaciones microbianas. Sin embargo, a través de estas metodologías solamente una pequeña fracción de la comunidad microbiana podía ser analizada (>1%) (Delmont et al., 2011) (Schloss & Handelsman, 2003), es por este motivo que ha sido un reto caracterizar las comunidades microbianas del suelo que incluyen principalmente bacterias, archaeas y hongos e identificar los cambios que sufren por perturbaciones del medio. Para tal fin han sido usados diferentes parámetros biológicos independientes de cultivo entre los que se encuentran la biomasa microbiana, la respiración, el ciclaje de nutrientes, las actividades enzimáticas y otros más específicos basados en el análisis de datos genómicos, los cuales sirven como indicadores para determinar cambios en la estructura y composición de la comunidad edáfica (Veum, Goyne, Kremer, Miles, & Sudduth, 2014) (Schloter, Nannipieri, Sørensen, & van Elsas, 2018). Todos estos indicadores permiten evaluar de forma holística el funcionamiento del suelo en base a la estructura, función metabólica y roles ecológicos que llevan a cabo los microorganismos edáficos, pudiendo además evaluar la actividad *in situ* a través de la cinética enzimática (Bastida, Zsolnay, Hernández, & García, 2008). El reciente acceso a herramientas de metagenómica basadas en el análisis del ADN, han permitido un gran avance en el estudio de las comunidades de organismos que habitan el suelo, puesto que las metodologías dependientes de cultivo no permitían considerar la totalidad de organismos de dichas comunidades. Técnicas como la secuenciación masiva de genes, han permitido obtener más información de las comunidades microbianas, su composición, dinámica y estructura, los roles y relaciones evolutivas con mayor grado de resolución a nivel taxonómico, así como también han permitido reconocer la influencia de los microorganismos sobre las propiedades y procesos de los ecosistemas edáficos de forma más detallada (Shendure & Ji, 2008) (Yang, Wang, & Qian, 2016).

1.7.1 Actividad enzimática en suelos

Las técnicas enzimáticas que evalúan el estatus de los suelos son usadas para caracterizar procesos biológicos mediante el uso de sustratos, además de servir como complemento a metodologías más especializadas, ya que permiten conocer la actividad metabólica que se está llevando a cabo en un momento determinado (Kirk et al., 2004) (Harris, 2007).

Las enzimas son proteínas que se unen a sustratos específicos cuya función es catalizar reacciones químicas (Henriquez et al., 2014). Las presentes en el suelo son mediadoras de procesos como la descomposición de la materia orgánica nativa y de la nueva que ingresa al sistema, la transformación de la energía y el ciclaje de nutrientes (Caldwell, 2005). Además, se consideran buenos indicadores de calidad del suelo, ya que la actividad metabólica es muy sensible a los cambios relacionados con el manejo de los cultivos y debido a que están directamente involucradas en la liberación de nutrientes inorgánicos por la degradación de la materia orgánica (Shukla & Varma, 2011).

A nivel edáfico son los microorganismos los principales productores de enzimas. Las enzimas pueden clasificarse de acuerdo a su localización, en intracelulares cuando se encuentran unidas a compartimientos dentro de la célula o en extracelulares cuando son liberadas durante el metabolismo o lisis celular. Estas últimas son posteriormente absorbidas en las arcillas minerales o se asocian a los coloides húmicos del suelo (Piccolo, 1996).

Estos catalizadores proteicos están directamente involucrados en la transformación de componentes orgánicos e inorgánicos del ciclo del nitrógeno (Mengel, 1996). Para cada una de las etapas del ciclo, se pueden distinguir una o varias enzimas. En ecosistemas de cultivo de arroz, las enzimas relacionadas con el ciclo del nitrógeno son importantes en el mantenimiento de la fertilidad del suelo y en el rendimiento de la cosecha (Adetunji, Lewu,

Mulidzi, & Ncube, 2017). En las etapas claves de ingreso de nitrógeno al suelo, se destacan la enzima nitrogenasa, responsable de la fijación y las enzimas proteasas y ureasas involucradas en el proceso de amonificación (Strock, 2008).

1.7.2 Nitrogenasa

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso dependiente de la enzima nitrogenasa (EC 1.18.6.1), capaz de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio. La enzima es un complejo formado por dos metaloproteínas: la ferroproteína y la molibdoferroproteína (Stein & Klotz, 2016). Este proceso es sensible a la presencia de oxígeno, motivo por el cual los organismos fijadores poseen mecanismos para evitar la desactivación de la enzima a través -por ejemplo- del manejo de altas tasas respiratorias o la colonización de compartimentos dentro de las plantas con poca oxigenación, que sirve como protección aislante además dentro de las estructuras nodulares, el nivel de oxígeno disminuye gracias a la acción de la enzima leghemoglobina, que se encarga de quelar átomos de oxígeno (Ott et al., 2005). La actividad de la enzima se correlaciona directamente con el contenido de materia orgánica, pues las bacterias fijadoras utilizan los productos de descomposición como fuente de energía. Jensen y Swaby evidenciaron una asociación directa entre la aplicación de los residuos de las plantas y el incremento en la actividad de fijación de nitrógeno (Jensen & Jensen, 1940).

1.7.3 Proteasa

Las proteasas (E.C. 3.4.21-) están involucradas en el proceso de amonificación del nitrógeno, siendo responsables de la tasa de mineralización al hidrolizar las proteínas para obtener amonio por la vía de los aminoácidos (Hayano, 1993). Son clasificadas de acuerdo a la ubicación de los enlaces peptídicos hidrolizados sobre los que actúan, en exopeptidasas, si actúan sobre aminoácidos terminales o endopeptidasas si catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos internos (Kirti, Rana, & Datt, 2012). La mayoría del nitrógeno presente en el suelo se encuentra en forma de N orgánico y necesita ser

transformado a su forma inorgánica para ser asimilable por las plantas, es así como la proteólisis es un proceso clave en el reciclaje de la materia orgánica, al degradar las glicoproteínas, proteínas, péptidos y aminoácidos provenientes de organismos muertos, plantas y animales (Vranova, Rejsek, & Formanek, 2013). La despolimerización mediada por proteasas es el paso que limita la velocidad de suministro de nitrógeno a las plantas ya que el suelo tiene una gran reserva de nitrógeno orgánico que se convierte en disponible gracias a la acción de esta enzima (Geisseler & Horwath, 2008).

Las proteasas son producidas por animales, plantas y microorganismos, siendo estos últimos los mayores productores. En suelos de cultivo de arroz bajo inundación, se ha relacionado al género *Bacillus* spp con la mayor producción de proteasas (Hayano, 1993). La actividad de la enzima está relacionada con el contenido de materia orgánica del suelo y la biomasa microbiana. El tamo de arroz contiene entre un 2 y un 7% de proteína neta, por lo cual la adición del tamo al suelo, puede llegar a mejorar levemente la actividad de esta enzima (Drake, Nader, & Forero, 2002).

1.7.4 Ureasa

La enzima ureasa también conocida como urea-amidohidrolasa (EC 3.5.1.5) cataliza la reacción de hidrólisis de la urea para generar amoníaco y carbamato, los cuales se hidrolizan espontáneamente para formar ácido carbónico y amonio respectivamente (Carlsson & Nordlander, 2010). Ésta enzima se encuentra asociada con el suministro de nitrógeno a las plantas ya que regula de forma natural el proceso de amonificación en el ciclo del nitrógeno por la descomposición de la materia orgánica o la hidrólisis de la urea contenida en los desechos animales, mientras que en suelos agrícolas se encuentra involucrada con el rendimiento de los fertilizantes nitrogenados que en su mayoría contienen urea (Makoi & Ndakidemi, 2008). Generalmente, su origen es microbiano y puede existir como una enzima intracelular o extracelular al ser adsorbida por las partículas inorgánicas como las arcillas o al vincularse con los complejos húmicos (Tabatabai & Bremner, 1972). La enzima ureasa ha sido ampliamente usada para evaluar cambios en

la calidad del suelo relacionados con prácticas de manejo, ya que representa hasta un 63% de la actividad enzimática total (Pettit, Smith, Freedman, & Burns, 1976). En suelos de cultivo de arroz, el uso de fertilizantes nitrogenados es muy común dado que los rendimientos obtenidos son mayores como resultado de la hidrólisis de amonio que es el nutriente que puede ser tomado directamente por las plantas (Nayak, Babu, & Adhya, 2007). La actividad de la enzima es influenciada por factores como el contenido de materia orgánica, las enmiendas adicionadas al suelo, el pH, la temperatura, la comunidad microbiana y otras propiedades físicas y químicas del suelo (Makoi & Ndakidemi, 2008). Los cambios en la actividad de la enzima pueden ser usados como un indicador indirecto del nitrógeno potencialmente disponible además sirven para determinar métodos de manejo de los cultivos que mejoren el metabolismo microbiano y el ciclo del nitrógeno (Adetunji et al., 2017).

1.7.5 Gen 16S rRNA para el estudio taxonómico de las comunidades de bacterias

Los métodos moleculares basados en análisis de ADN han provisto en los últimos años un mejor entendimiento de la diversidad filogenética y composición de la comunidad microbiana al ser más robustos que las metodologías dependientes de cultivo. La mayoría de investigaciones de este tipo emplean genes que funcionan como marcadores filogenéticos. En la actualidad, el gen 16S rRNA es el gen marcador más utilizado para la evaluación de la diversidad de microorganismos en diferentes ambientes así como para los estudios relacionados con la filogenia (Vasileiadis et al., 2012). De hecho, el árbol filogenético de la vida está construido sobre la base de este gen; de esta manera Carl Woese comparando secuencias de RNA ribosomal dio una nueva clasificación de los dominios de los seres vivos (Woese, Kandler, & Wheelis, 1990). El gen 16S rRNA codifica para el RNA ribosomal de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariotas (Brimacombe & Stiege, 1985). Este polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos ha sido escogido como marcador universal para las comunidades de bacterias y archaeas al estar involucrado en la síntesis de proteínas, siendo poco afectado por las presiones ambientales (Case et al., 2007). El gen 16S rRNA cuenta con regiones muy conservadas, que permiten el diseño de primers o iniciadores capaces de amplificar

prácticamente todas las regiones que lo codifiquen, además de contar con regiones con alta divergencia que hacen posible la caracterización diferencial de microorganismos a nivel taxonómico (Yang et al., 2016). En total son 9 regiones hipervariables, designadas V1 hasta la V9, que muestran una diversidad significativa en su secuencia a través de diferentes especies microbianas y pueden ser usadas solas o en combinación para caracterizar taxonómicamente sin utilizar la secuencia completa del gen (Yang et al., 2016).

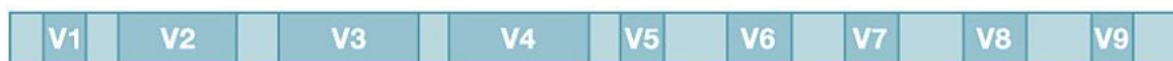


Figura 4 Representación estructura gen 16s rRNA. V1-V9 Regiones variables. Los recuadros claros representan las regiones conservadas.

Las regiones hipervariables se encuentran junto a regiones altamente conservadas, lo que permite amplificarlas utilizando cebadores universales para estos tramos, sin embargo no todas las regiones son capaces de distinguir entre diferentes microorganismos dado que tienen diferentes grados de divergencia en sus secuencias. Se han relacionado las regiones V2, V3, V4 y V6 como las que mayor heterogeneidad presentan convirtiéndose de esta manera en las más recomendadas para los estudios filogenéticos (Chakravorty, Helb, Burday, Connell, & Alland, 2007). Para caracterizar estas secuencias es necesario determinar la serie de nucleótidos de la muestra y compararla con secuencias nucleotídicas conocidas de organismos previamente secuenciados (Hernández-León et al., 2010) (Devereux & Wilkinson, 2004). Para esto han sido utilizadas diferentes metodologías de secuenciación entre las que se destacan la pirosecuenciación y la secuenciación por síntesis (Illumina / Solexa) (Ambardar et al., 2016), siendo esta última la más utilizada hoy en día por su accesibilidad, alta precisión y generación de grandes cantidades de datos. Esta secuenciación por síntesis consiste en secuenciar fragmentos previamente preparados con adaptadores en los extremos, para permitir que sus cadenas desnaturalizadas puedan unirse a una superficie sólida. Luego se hace una amplificación tipo puente para generar grupos o clusters de cadenas de ese mismo fragmento,

permitiendo rastrear la adición de nucleótidos marcados fluorescentemente a medida que se copia la cadena de ADN base lo cual es detectado por una cámara. A diferencia de la pirosecuenciación, la secuenciación por síntesis incorpora un solo nucleótido en cada ciclo de amplificación haciendola más precisa (Mardis, 2017).

Como se explicó anteriormente, el análisis del gen 16S rRNA, sirve para caracterizar taxonómicamente una comunidad de microorganismos, pero debido a que se enfoca en el estudio de un solo gen no puede identificar directamente las capacidades funcionales de los microorganismos secuenciados. Es así como las caracterizaciones funcionales requieren de la secuenciación de varios genes clave o de todos los genes de la comunidad de microorganismos para producir perfiles funcionales en detalle (Langille et al., 2013). Gracias a los avances en el análisis de datos biológicos, herramientas bioinformáticas han sido desarrolladas para obtener una predicción del potencial funcional de las comunidades de microorganismos una vez se tiene conocimiento de su composición taxonómica, lo anterior basado en la estrecha relación que puede encontrarse entre la filogenia y la función (Zaneveld, et al., 2010). Se puede observar por ejemplo, en los árboles filogenéticos construidos a partir del gen 16S rRNA, que los taxones tienden a organizarse en grupos o clusters, coincidiendo dicha agrupación con el contenido de genes que comparten (Vigdis Torsvik & Øvreås, 2002). Esta agrupación de microorganismos que comparten un *coregenoma* (genes presentes en todos los taxones) (Medini, Donati, Tettelin, Massignani, & Rappuoli, 2005) permite suponer funciones en común, las cuales son asignadas de acuerdo a análisis previos que han podido revelar esta relación (Langille et al., 2013).

En el momento existen varias herramientas bioinformáticas que mediante el uso de algoritmos, proveen predicciones funcionales a partir de la información de la secuenciación de las regiones del gen 16S rRNA. Es decir que a partir del conocimiento de la función que cumplen ciertos microorganismos filogenéticamente y previamente caracterizados, se puede utilizar solo la información filogenética de una muestra para asignarles ciertas funciones. Las predicciones funcionales podrían consolidarse con los resultados provenientes de actividades metabólicas medidas in vitro, las cuales reflejan gran parte del funcionamiento del nicho bajo estudio (Langille et al., 2013).

3 Evaluación de la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad
2 microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno en suelos de
cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo

2. Antecedentes, planteamiento de la investigación y objetivos

2.1 Antecedentes

En los últimos años, numerosos estudios han evaluado la influencia de diferentes prácticas de manejo del tamo de arroz sobre las comunidades microbianas del suelo a corto, mediano y largo plazo, buscando proveer bases que ayuden a determinar el manejo adecuado de estos residuos (C. Liu et al., 2014) (Sun et al., 2015) (Francioli et al., 2016) (Guo et al., 2018) (Maarastawi et al., 2018).

Estos estudios han elucidado que los cambios en la actividad microbiana que resultan de la adición de material vegetal al suelo pueden transformar la estructura y composición de los microorganismos al cambiar algunas características del hábitat como la porosidad, la humedad y la cantidad de sustratos (Gary et al., 2004), lo anterior ha permitido usar a los microorganismos como indicadores del estado trófico del suelo. Estos cambios han sido medidos por diferentes metodologías, desde las más tradicionales mediante mediciones de los parámetros físico-químicos del suelo, actividades enzimáticas, metodologías dependiente de cultivo hasta las más actuales: tasas de respiración, PFLA (Análisis de ácidos grasos) (Pan, Li, Chapman, & Yao, 2016), PCR (Li et al., 2018) y secuenciación de próxima generación (Maarastawi et al., 2018), estas últimas actualmente reconocidas por el nivel de resolución que permiten.

Otros estudios sugieren que el retorno de material vegetal parece generar una mayor biomasa microbiana (C. Liu et al., 2014) (J. Guo et al., 2018), además de seleccionar taxones específicos que se adaptan a las disponibilidades de nutrientes derivados de su degradación generando cambios en la composición de la comunidad (LI et al., 2015). Es por esto que se ha investigado más a fondo los grupos funcionales que cumplen una tarea en específico, pues este nivel de detalle permite una mejor comprensión de la influencia que tienen los cambios del medio sobre procesos específicos (Bao et al., 2012) (Bao et al., 2019). Por ejemplo ha sido comprobado que el retorno de los residuos vegetales incrementa la abundancia de la comunidad de bacterias fijadoras de N, posiblemente por una mayor disponibilidad de fuentes energéticas (Zhang et al., 2013), así como limita la pérdida de nitrógeno del sistema suelo, sugiriendo que la reincorporación del tamo de arroz es capaz de modular la comunidad microbiana que interviene en el ciclo del nitrógeno. Sin embargo, muchos de los estudios que investigan los cambios en la microbiota edáfica relacionada con las transformaciones de nitrógeno se basan en las comunidades de bacterias metanogénicas y poco ha sido desarrollado hacia la comprensión de los demás subprocesos del ciclo (Henderson et al., 2010) (Miller et al., 2012) y los pocos estudios realizados para determinar los cambios generados sobre las comunidades edáficas luego de la incorporación de tamo de arroz al suelo, han sido desarrollados bajo condiciones controladas centrándose principalmente en la disponibilidad de nutrientes como el carbono, el contenido de materia orgánica y la comunidad microbiana celulolítica (Chowdhury & Chowdhury, 2016)

En Colombia, se han realizado estudios para promover el proceso de descomposición del tamo de arroz bajo condiciones de campo usando consorcios microbianos junto con aplicaciones de nitrógeno inorgánico para evitar el efecto de inmovilización (Cruz Ramírez et al., 2017), sin embargo, estos estudios fueron más enfocados a los cambios en las variables agronómicas. Hasta el momento no se ha llevado a cabo un estudio que evalúe el impacto que generan diferentes prácticas de manejo del tamo de arroz sobre la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno, evaluado a través de herramientas de metagenómica y actividad metabólica, el cual podría servir para

determinar un mejor manejo de estos residuos vegetales, lo cual impacta directamente la calidad del suelo e indirectamente la productividad de cultivos agrícolas.

2.2 Planteamiento del problema

Se ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas para aprovechar de forma óptima los residuos vegetales en pro de cerrar de manera adecuada los procesos agrícolas con el menor impacto ambiental. Uno de los potenciales usos de los desechos del cultivo de arroz, definidos como tamo, es el poder retornarlo *in situ* para un aprovechamiento sostenible. Sin embargo los diferentes manejos de este residuo, como la incorporación, la cobertura del suelo o la quema, suponen un disturbio para las comunidades de microorganismos edáficos, especialmente aquellos grupos funcionales relacionados con los ciclos biogeoquímicos. Debido a que los microorganismos relacionados con el ciclo del nitrógeno, pueden contribuir a la nutrición de las plantas, a la producción del cultivo y al mejoramiento de las propiedades del suelo, es de gran interés determinar cómo las prácticas de manejo de los residuos influyen en la composición, estructura y funcionamiento de estas comunidades.

2.3 Pregunta de investigación

¿Cómo cambian las comunidades de microorganismos del suelo relacionadas con el ciclo del nitrógeno taxonómica y funcionalmente bajo los diferentes manejos del tamo de arroz?

2.4 Hipótesis

Dado el potencial del tamo de arroz como fuente de material orgánica, las comunidades de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno se ven influenciadas positivamente cuando el tamo de arroz es incorporado al suelo o dejado en cobertura en comparación con la práctica de quema del mismo. Lo anterior soportado en estudios que evidencian que la incorporación del tamo mejora las propiedades físico-químicas del suelo (Mousavi et al., 2012), incrementa el contenido de materia orgánica, mejora la fertilidad del suelo (Zhang et al., 2013), incrementa el contenido de carbono y nitrógeno total, promueve el crecimiento

vegetal y la toma de nitrógeno por parte de las plantas de arroz a largo término (Takahashi et al., 2003).

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del manejo del tamo de arroz sobre la diversidad taxonómica y funcional de las comunidades microbianas del suelo asociadas al ciclo del nitrógeno, antes y durante un ciclo de cultivo de arroz en condiciones de campo.

2.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la diversidad taxonómica de bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno de suelos bajo diferentes manejos del tamo de arroz.
- Predecir la función de los microorganismos relacionados con el ciclo del nitrógeno a partir de la diversidad taxonómica encontrada en los suelos con diferentes manejos del tamo de arroz.
- Determinar el efecto de los diferentes tratamientos del tamo de arroz sobre la actividad de las enzimas ureasa, proteasa y nitrogenasa.

2.6 Materiales y métodos

2.6.1 Área de estudio

El experimento en campo se llevó a cabo en la Estación de Investigación de la Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz) en el municipio de Saldaña, Tolima (3°54'56.4"N, 74°58'57E). El área de estudio presenta un clima promedio de 28°C con una precipitación anual de 210 mm.

2.6.2 Material biológico

Siguiendo la línea de investigación desarrollada en el grupo de microbiología agrícola de la Universidad Nacional de Colombia, se utilizó el consorcio de microorganismos compuesto por la cepa bacteriana perteneciente a la colección de genes y cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, *Bacillus pumilus* IBUN 13A-02 a una concentración de $1,7 \times 10^7$ esporas/ml aislada de la rizósfera de arroz, en conjunto con una cepa comercial de *Trichoderma harzianum* a una concentración de $1,0 \times 10^6$ conidias/ml comercializada por la empresa Biocontrol SAS para la inoculación de los tratamientos de incorporación y cobertura en campo. El consorcio anteriormente descrito proviene de un proceso de selección mediante tamizaje funcional utilizando tamo de arroz como sustrato, llevado a cabo en un estudio previo de doctorado.

Por su parte, fue utilizada la variedad FL-Fedearroz 68 caracterizada por presentar tolerancia a *Pyricularia grisea* y susceptibilidad a *Rhizoctonia solani* para el desarrollo del cultivo, la cual había sido sembrada previamente en el área de estudio.

2.7 Diseño experimental

En orden de evaluar el efecto a corto plazo de diferentes prácticas de manejo del tamo de arroz sobre la comunidad microbiana relacionada con el ciclo del nitrógeno bajo condiciones de campo, se plantearon 4 tratamientos de manejo del tamo de arroz que incluían: cobertura del terreno con tamo de arroz inoculado con el consorcio de microorganismos (Cob + mo), incorporación del tamo de arroz inoculado previamente con el consorcio microbiano (Inc + mo), quema convencional del tamo de arroz (Quema) y cobertura del terreno con tamo de arroz sin adición del inóculo microbiano (Cob). Los tratamientos de incorporación con microorganismos (Inc + mo) y quema (Quema) fueron incorporados al suelo durante el primer día del experimento de forma mecánica mediante arado. Por su parte, los tratamientos de cobertura del terreno con tamo de arroz -tanto el inoculado como el no inoculado- (Cob + mo y Cob) fueron dejados sobre el terreno durante 22 días después del inicio del experimento, luego de este tiempo fueron incorporados al suelo mediante arado para preparar el terreno para la siembra del cultivo (Fig. 5).

Las muestras de suelo fueron tomadas en 4 muestreos antes y durante el ciclo de cultivo, definidos como: Etapa Inicial (muestreo de los suelos antes de recibir cualquier tipo de tratamiento), Etapa de incorporación (22 días después de la aplicación de los tratamientos), Etapa floración (Floración del cultivo) y Etapa final (Antes de la recolección de la cosecha). El experimento fue desarrollado entre los meses de abril y octubre de 2016 (Fig. 6).

El área experimental fue dividida en 16 secciones de 4,5 m x 7,5 m (33,75 m²) considerando 4 réplicas para cada uno de los tratamientos.

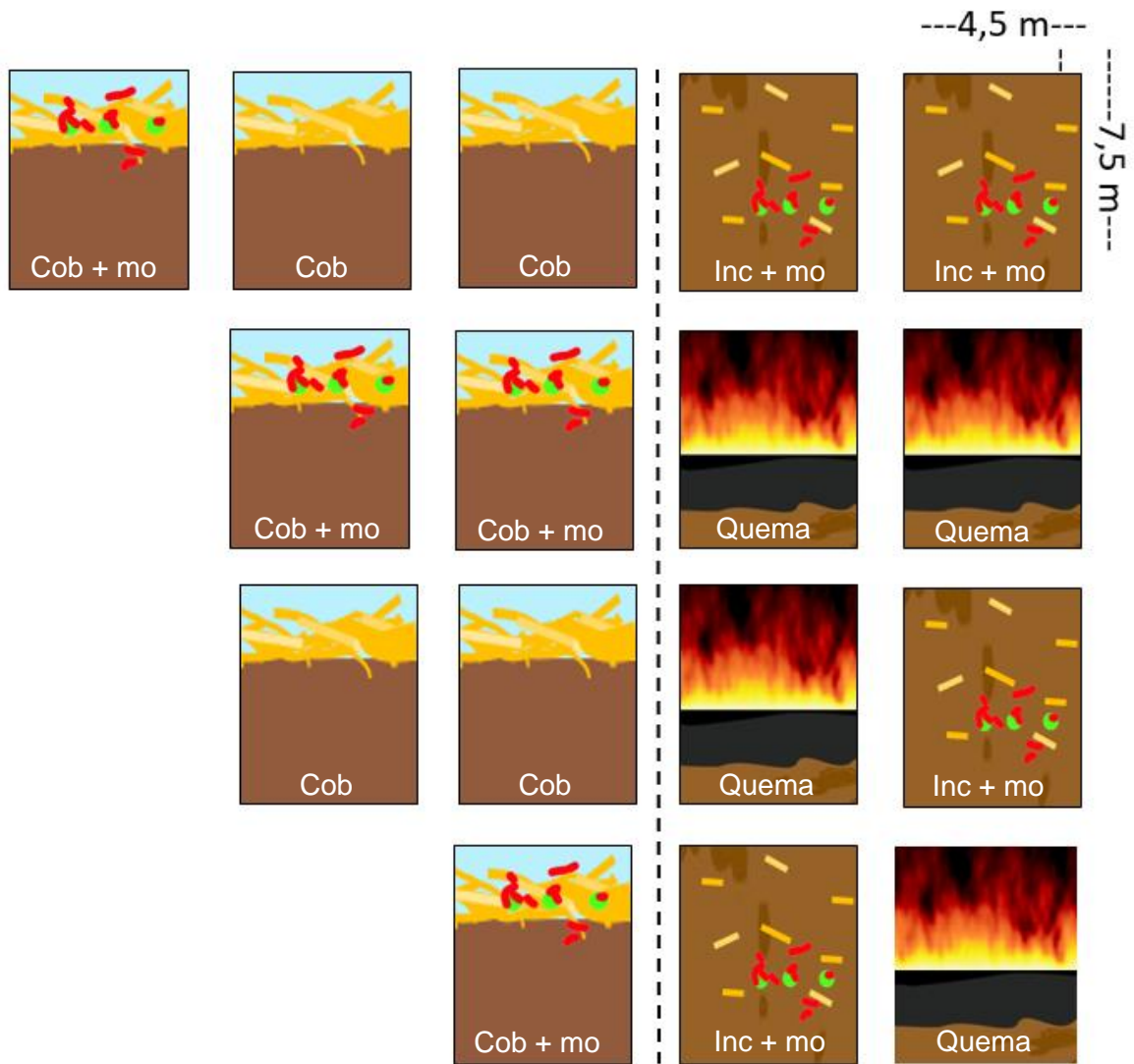


Figura 5 Diseño experimental

Se observan al lado izquierdo de la línea punteada, las parcelas de los tratamientos dejados como cobertura del terreno (Cob + mo y Cob), y a la derecha de la línea punteada, se ubican los tratamientos incorporados al suelo durante el primer día del experimento (Inc + mo y Quema). Las réplicas de los tratamientos dejados en cobertura como de los incorporados al suelo mediante arado, fueron distribuidas de acuerdo a un diseño de bloques incompletos al azar, teniendo como base el uso de maquinaria pesada (tractor) en cada área.

Todos los tratamientos recibieron el mismo esquema de fertilización inorgánica, que consistió en la aplicación de 229,1 kg de N/ha⁻¹, 28,6 kg P/ha⁻¹, 85,5 kg K/ha⁻¹, 47,4 kg S/ha⁻¹ y 3,0 kg Zn/ha⁻¹ según recomendaciones de Fedearroz.

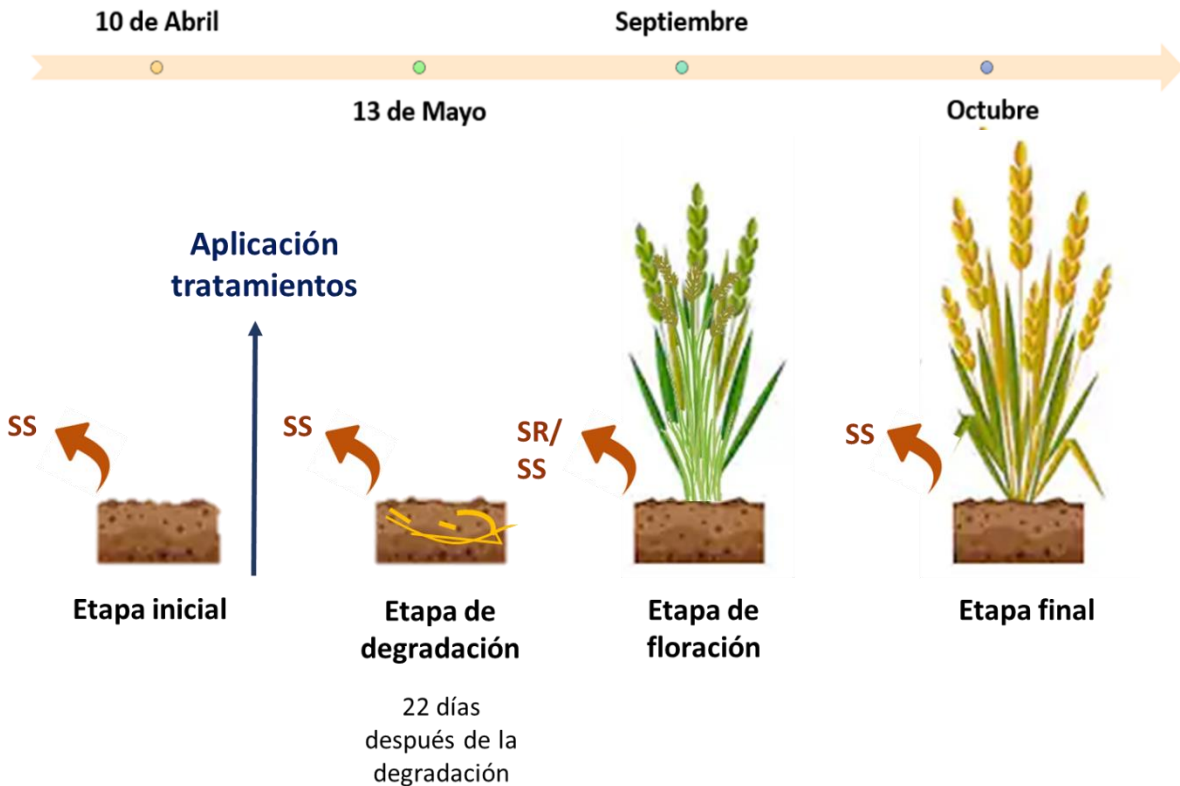


Figura 6. Cronología del muestreo. SS: Suelo de soporte; SR: Suelo rizosférico.

2.7.1 Procedimientos de muestreo

Las muestras de suelo fueron recolectadas de cada una de las parcelas con ayuda de un barreno, realizando submuestras de 5 puntos diferentes dentro de cada parcela distanciados espacialmente, estas submuestras fueron mezcladas uniformemente para obtener una muestra compuesta como se ilustra a continuación:

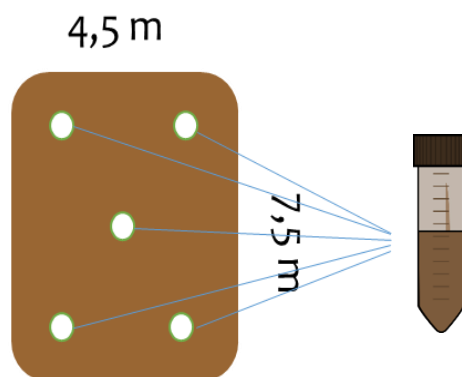


Figura 7 Metodología de muestreo por parcela

2.7.2 Recolección de muestras de suelo

Para cada una de las etapas de muestreo (inicial, incorporación, floración y final) fue muestreado suelo de soporte de las cuatro parcelas correspondientes a cada uno de los tratamientos, extrayendo suelo superficial entre los 0 y 10 cm de profundidad con ayuda de un barreno; estas muestras fueron destinadas para la evaluación de la actividad enzimática del suelo. Por su parte, para realizar los análisis taxonómicos y de diversidad de la comunidad microbiana, se realizaron extracciones de ADN genómico, tomando muestras de suelo de soporte de las etapas inicial, incorporación y final y muestras de suelo rizosférico –únicamente- durante la etapa de floración. Para estos análisis fue muestreado suelo de tres de las cuatro parcelas de cada uno de los tratamientos. Las muestras de suelo de soporte fueron transportadas hasta el laboratorio, procesando las muestras destinadas a la extracción de ADN inmediatamente mientras que las destinadas para la evaluación de las actividades enzimáticas fueron almacenadas -20°C hasta su análisis. En cuanto a la recolección de las muestras de suelo rizosférico, destinadas para los análisis de ADN, se removieron plantas del cultivo seguidas de una agitación manual para descartar agregados del suelo. El suelo que se mantuvo unido a la raíz de la planta fue considerado como suelo rizosférico. Posteriormente, las raíces de las plantas fueron colocadas en tubos de 50 ml de capacidad y sumergidas en 30 ml de buffer fosfato 1X adicionado con Tween 20 al 2% (v/v), para ser mezcladas posteriormente durante 10 minutos en un agitador Multi-wrist R. Luego, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 7000 rpm. Se realizó una segunda extracción de suelo rizosférico usando el

pellet sobrante luego de la centrifugación. El suelo extraído fue recolectado y procesado de forma inmediata para la extracción de ADN.

2.8 Ensayos enzimáticos

Se evaluó la actividad de las enzimas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, en específico las asociadas con procesos de ingreso de nitrógeno al sistema edáfico. La actividad de las enzimas proteasa y ureasa se determinó colorimétricamente usando el fotómetro lector de microplacas Multiskan TM FC (Thermo Fisher Scientific). Para la determinación de la actividad de la enzima nitrogenasa se utilizó cromatografía de gases, realizando lecturas en el equipo GC-2014 (Shimadzu) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

2.8.1 Proteasa

La actividad de la enzima proteasa de las diferentes muestras de suelo se realizó de acuerdo al método de Ladd y Butler, basado en la determinación de aminoácidos liberados luego de la incubación de las muestras de suelo en buffer Tris (50mM) con pH 8,1, adicionando caseinato de sodio como sustrato e incubando la mezcla durante dos horas a una temperatura controlada de 50°C. Luego del periodo de incubación, la reacción enzimática fue detenida por la adición de ácido tricloroacético al 15%. Los aminoácidos liberados durante la incubación son extraídos mediante centrifugación, quedando liberados en el sobrenadante. Posteriormente, una alícuota del sobrenadante reacciona con el reactivo de Folin-Ciocateu en solución alcalina y la cantidad de aminoácidos es determinada colorimétricamente. (Ladd & Butler, 1972).

Las determinaciones de la actividad enzimática fueron realizadas por cuadruplicado de cada muestra contra cuatro controles blanco respectivamente y expresadas en mg de tirosina producidos por 1 gr de suelo seco después de 2 horas de incubación a 50°C.

2.8.2 Ureasa

Las muestras de suelo fueron procesadas para la determinación de la actividad ureásica según el protocolo de Kandeler y Gerber, que consiste en la determinación colorimétrica del amonio liberado luego de la incubación de las muestras de suelo con una solución de Buffer borato (28,4 gr/L), pH 10, junto con una solución de urea al 20% como sustrato. La anterior mezcla fue incubada por dos horas a una temperatura controlada de 37°C. Pasado este tiempo, la reacción enzimática es detenida adicionando de Cloruro de potasio.

La enzima tiene un papel importante en el ciclo del nitrógeno, especialmente en el proceso de amonificación de los fertilizantes nitrogenados (Kandeler & Gerber, 1988).

Las determinaciones de la actividad enzimática fueron realizadas por cuadruplicados de cada muestra contra cuatro controles respectivamente. Los resultados fueron corregidos con los blancos y expresados en $\mu\text{g NH}_4\text{-N}$ producidos por 1 gramo de suelo seco después de 2 horas de incubación a 37°C.

2.8.3 Potencial de la enzima nitrogenasa

El potencial de la actividad de la enzima nitrogenasa fue determinada mediante el ensayo de reducción del acetileno a etileno en una reacción similar a la que se da en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico. Esto debido a que la enzima nitrogenasa no es específica para el nitrógeno sino que también es capaz de reducir otros gases como acetileno, cianuro y otros compuestos unidos por enlaces triples.

El método se basa en la estimación del etileno producido durante la reducción del acetileno, en muestras de suelo contenidas en viales de vidrio ámbar cerrados herméticamente con el fin de controlar la atmósfera. Se realiza modificación del método según Limmer y Drake (Limmer & Drake, 1996) y las muestras son adicionadas con una solución de glucosa/manitol 10 g/L. Posteriormente, a los viales se les retira el 20% v/v de la atmósfera con ayuda de una jeringa y el mismo volumen retirado es reemplazado con

acetileno (C_2H_2 pureza del 99,5%), que en este caso actúa como sustrato. Luego los viales son incubados por 3 días a 32°C. Al finalizar el periodo de incubación, se retira 1 ml de la atmósfera y se realiza la medición del acetileno incorporado y del etileno producto de la actividad enzimática, en el cromatógrafo de gases, usando N como gas de arrastre (Hardy et al., 1968).

La determinación cuantitativa de las moles de etileno producidas es calculada a través de una curva de calibración, usando una solución estándar de etileno (C_2H_4 pureza del 99,5%) a una concentración de $3,061 \times 10^{-4}$ mol/L de etileno y realizando diluciones con aire atmosférico hasta $1,53 \times 10^{-5}$ mol/L. Las mediciones de la curva, se realizan inyectando 1 ml de cada dilución por triplicado al cromatógrafo y se calcularon las concentraciones de etileno usando la ecuación de los gases ideales (Mcnabb & Geist, 1979). Las determinaciones del potencial de la enzima nitrogenasa fueron realizadas por triplicado y expresadas en nmol de etileno producidas en un gramo de suelo seco por hora.

2.9 Extracción de ácidos nucleicos, amplificación y secuenciación

La extracción del ADN total de las muestras de suelo (250 mg) fue realizada usando el kit de extracción MoBio PowerSoil DNA (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y calidad (tamaño promedio) del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras extraídas fueron cuantificadas en el equipo Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Las muestras de ADN fueron secuenciadas en la Universidad de Wisconsin en el Centro de Biotecnología Madison. Las concentraciones de ADN de las muestras fueron validadas fluorométricamente con los kits Qubit dsDNA HS Assay y Quant-iT™ PicoGreen dsDNA.

El ADN genómico fue amplificado usando el set de primers universales 341F y 805R, los cuales amplifican las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA generando un producto de 464 pb. Los amplificados fueron secuenciados en la plataforma Illumina MiSeq, bajo la metodología paired end. El set de primers forward y reverse contenían códigos de 12 pares de bases, permitiendo multiplexar las secuencias en librerías por corrida en la plataforma MiSeq.

2.9.1 Análisis de secuencias del gen 16S rRNA

La calidad de las secuencias paired end fue evaluada de manera preliminar con el software Fast QC v 0.11.6 (Andrews, 2010), evidenciando que las secuencias reverse presentaban una baja calidad que no permitían una adecuada unión con las secuencias forward, motivo por el cual se ingresaron únicamente las secuencias forward al programa QIIME2 v 2018.4 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2018) para llevar a cabo el proceso de calidad y los análisis de diversidad. Las secuencias fueron demultiplexadas usando el plugin “demux” de acuerdo a su código de secuencia. La limpieza y dereplicación de las secuencias fue realizada usando el pipeline de DADA2 (Callahan et al., 2016) dentro del programa QIIME2. Las secuencias de las etapas inicial, incorporación y final fueron procesadas de manera independiente a las secuencias provenientes de la etapa de floración, por tratarse de muestras de suelo de soporte y suelo rizosférico respectivamente, además las muestras de las etapas inicial, de incorporación y final presentaban una calidad de secuenciación similar, pues fueron secuenciadas en simultáneo (en una misma corrida). Para estas muestras se realizó un filtro de calidad inicial usando el plugin “quality-filter q-score” del programa QIIME2 para dejar las secuencias forward y reverse con una calidad mínima correspondiente a un Phred score de 20 (Precisión del 99%) y una longitud mínima de 180 pb. Posteriormente se realizó un corte de la secuencia en la posición 180 en el extremo 3´ y se realizó un corte en la posición 10 del extremo 5´. Las secuencias quiméricas fueron removidas usando el plugin “isBimeraDenovo” y los singetons o secuencias con sólo una copia dentro del grupo de datos, fueron removidas como parte inherente del proceso de los datos con el algoritmo del programa DADA2.

Por su parte, las secuencias forward y reverse de la etapa de floración presentaban una calidad de secuenciación más alta, motivo por el cual sólo se realiza un corte en la posición 271 del extremo 3' para eliminar las pares de bases con baja calidad sin necesidad de hacer un filtro preliminar; las secuencias quiméricas de la etapa de floración fueron removidas dentro del proceso de calidad realizado por el programa DADA2. El programa DADA2 (Divisive Amplicon Denosing Algorithm) permite diferenciar la variación biológica genuina de los errores aleatorios provenientes del proceso de secuenciación mediante la aplicación de un algoritmo de partición divisiva. Las unidades taxonómicas operaciones, conocidas como OTUs resultantes del proceso con DADA2, son generadas por agrupación de secuencias únicas y definidos como “variantes de secuencia de amplicones” (ASVs por sus siglas en inglés), las cuales pueden ser relacionadas con una agrupación de secuencias al 100% de similaridad. Los ASVs fueron asignados taxonómicamente usando el plugin “classify-sklearn” (Bokulich et al., 2018) contra la base de referencia SILVA 128 (Quast et al., 2013).

El cálculo de las métricas de diversidad alfa y beta fue realizado con el método “core metrics phylogenetic” dentro del pipeline de QIIME2 con una profundidad de sub-muestreo uniforme (rarefacción) de 31.951, 33.772 y 28.916 para las muestras de los tiempos inicial, incorporación y final respectivamente y a una profundidad de submuestreo de 48.960 para las muestras rizosféricas de la etapa de floración. Adicionalmente los resultados de cada uno de los tratamientos para los tiempos inicial, incorporación y final fueron agrupados y analizadas, para determinar los cambios de cada tratamiento a través del tiempo, para lo cual fueron unificadas e ingresadas al programa QIIME2 realizando submuestréos de 33.258, 32.912, 28.933 y 31.926 secuencias para los tratamientos COB+MO, INC+MO, QUEMA y COB respectivamente. Las muestras de la etapa de floración no fueron tenidas en cuenta para el análisis grupal dado que no comparten la misma naturaleza de las muestras de suelo de soporte. Para el análisis de diversidad fue necesario realizar un árbol de punto medio usando el pipeline “align-to-tree-mafft- fasttree” en el programa FastTree (Price, Dehal, & Arkin, 2010) como parte del proceso dentro del programa QIIME2.

Para una interpretación significativa de los datos secuenciados, se realizaron las respectivas curvas de rarefacción que confirmen una cobertura adecuada de la comunidad microbiana, medida por la normalización de la diversidad de especies encontradas en la muestra como función del número de secuencias obtenidas.

2.10 Predicción funcional

El software PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) v.1.1.3 (<https://github.com/picrust/picrust/releases>) (Langille et al., 2013), fue usado para predecir el potencial funcional de las comunidades de bacterias de cada uno de los tratamientos. Este programa compara las secuencias de 16S rRNA identificadas con secuencias de especies de genomas conocidos (base de datos Green genes). El análisis predictivo es solo una aproximación de la posible actividad metabólica de la comunidad microbiana, en base a genomas conocidos de referencia.

Para realizar el proceso dentro del programa PICRUSt , las muestras derivadas del proceso de QIIME2, antes de la asignación taxonómica fueron seleccionadas y agrupadas en OTUs al 97% contra la base de datos Greengenes v.13.5.(DeSantis et al., 2006). La predicción del metagenoma fue realizado luego de normalizar el número de copias del gen 16S rRNA usando la función `normalize_by_copy_number` de PICRUSt. Las predicciones funcionales fueron realizadas usando la base de genes ortólogos KEGG. Los grupos de genes ortólogos (KO) resultantes fueron luego categorizados por función para vincularlos con rutas metabólicas. Fue además calculado el índice NSTI (Nearest-sequenced taxón index) dentro del pipeline de PICRUSt como control de calidad para validar la precisión de las anotaciones funcionales predichas.

De manera paralela, fueron tomadas las asignaciones taxonómicas de las muestras de cada uno de los tratamientos, derivadas del cotejo con la base de datos SILVA 128 dentro del pipeline con QIIME2 y se realizó una comparación con la base de datos MetaCNP <http://168.176.54.15/sph2/www/home.php> alojada en la IP: 168.176.54.15 de la Universidad Nacional de Colombia. Las asignaciones taxonómicas de las muestras que coincidieron con asignaciones taxonómicas de la base de datos MetaCNP a nivel de género fueron vinculadas a los subprocesos del ciclo del nitrógeno descritos en la base de datos para cada microorganismo, a través de matrices dinámicas y los porcentajes de los taxones asignados a cada subproceso del ciclo del nitrógeno fueron comparados entre tratamientos usando la prueba de Kruskal Wallis.

2.11 Herramientas gráficas

Las métricas de diversidad beta fueron representadas con gráficos de análisis de coordenadas principales de escalamiento multidimensional (PCoA) usando la herramienta Emperor (<http://emperor.microbio.me/uno/>) (Vázquez-Baeza, Pirrung, Gonzalez, & Knight, 2013) dentro del flujo de trabajo de QIIME2. Los gráficos de PCoA se basan en distancias euclidianas que agrupan las muestras considerando la posibilidad de unión de grupos por el método de varianza mínima.

Fueron usados adicionalmente los programas Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) para generar dendogramas de árbol basados en agrupamientos jerárquicos utilizando la distancia de similaridad/disimilaridad de Bray Curtis (Dhariwal et al., 2017) y el programa MetaComet (<https://probes.pw.usda.gov/MetaCoMET/>) para generar mapas de calor para mostrar las diferencias en las composiciones de la comunidad basadas en las abundancias relativas de los ASVs pertenecientes al core de microorganismos de cada tratamiento, generando un gradiente de color de acuerdo a la abundancia relativa de cada ASV dentro de una

muestra dada y agrupando las muestras de acuerdo a la distancia de Bray Curtis (Wang et al., 2016).

2.12 Análisis estadístico

A los resultados de las actividades enzimáticas se les aplicaron las pruebas bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff para evaluar si los datos se ajustaban a una distribución normal y la prueba de Levene's para la homogeneidad de varianzas. Los datos no se ajustaban a la normalidad, razón por la cual se utilizó el test de Kruskal Wallis, con el método de corrección de Bonferroni ($P \leq 0.05$) para determinar las diferencias significativas entre tratamientos usando el software Statgraphics Centurion v XVI <https://statgraphics.net>.

Los análisis de diversidad alfa fueron estimados en base a los ASVs de las muestras y se usaron los índices de riqueza (número de ASVs encontrados por muestra) (Callahan, McMurdie, & Holmes, 2017), Shannon (Shannon, 1948) y equitabilidad (Pielou, 1966) para evaluar cambios en las comunidades bacterianas de acuerdo a los tratamientos aplicados. El esfuerzo de muestreo fue evaluado usando el índice de cobertura de Good (Good, 1953). Las diferencias significativas de la diversidad alfa entre grupos de muestras fueron calculadas por un análisis pareado usando el test de Kruskal-Wallis, realizando una corrección de tipo Benjamin-Hochberg (Thissen, Steinberg, & Kuang, 2002) del valor de significancia (valor p) y para evaluar las diferencias significativas de la diversidad beta entre los diferentes grupos de tratamientos, fue utilizado un análisis permutacional multivariado PERMANOVA sobre la matriz de datos del índice de Bray Curtis.

El programa STAMP (<http://kiwi.cs.dal.ca/Software/STAMP>) fue utilizado para realizar la comparación entre tratamientos de las funciones metabólicas del metagenoma predichas con el programa PICRUSt (Parks et al., 2014), usando el test de Kruskal-Wallis con corrección de tests múltiples de Benjamin Hochberg para determinar los grupos diferentes. Por su parte, las diferencias entre tratamientos de las abundancias de taxones vinculados a subprocesos del ciclo del nitrógeno de acuerdo a la base de datos MetaCNP, fueron

realizadas con el test de Kruskal Wallis con el software Statgraphics Centurion v XVI <https://statgraphics.net>.

3. Resultados

Efectos de los diferentes tratamientos de tamo sobre la comunidad bacteriana

Se obtuvieron un total de 2.413.481 secuencias pertenecientes al fragmento del gen 16S rRNA durante las etapas muestreadas: inicial (513.611), incorporación (544.680), floración (803.226) y final (551.964). Cada una de las etapas de muestreo contenía 12 muestras, correspondientes a tres parcelas para cada uno de los tratamientos. Las secuencias fueron filtradas usando el algoritmo DADA2, obteniendo 2.917 ASVs en la etapa inicial, 2.842 ASVs en la etapa de incorporación, 4.698 en la etapa de floración y 3.513 ASV's en la etapa final de muestreo (Fig. 8), de las cuales 1.482 (50,8%), 1.321 (46,48%), 2.066 (44%) y 1.626 (46,2%) respectivamente fueron asignadas taxonómicamente usando la base de datos SILVA 128. Las curvas de rarefacción para cada uno de los tiempos muestreados alcanzaron la fase Plateau (Anexo A), indicando que se pudo capturar gran parte de la diversidad de la comunidad microbiana durante el muestreo. El número de secuencias totales incrementó de forma notoria en las muestras de suelo rizosférico recolectadas durante la etapa de floración, en comparación con las de las otras etapas y que correspondían a suelo de soporte, lo cual puede ser explicado por la eficiencia del método de concentración y extracción de DNA para los suelos rizosféricos y/o también por el efecto rizosférico, en el cual la biomasa (densidad poblacional) y la actividad de los microorganismos es potenciada por los exudados de las raíces de las plantas (Hussain et al., 2012), al contener grandes cantidades de carbono, azúcares, oligosacáridos, vitaminas, auxinas y otros elementos que sirven como fuente de alimento para los

microorganismos (Pinton, Varanini, & Nannipieri, 2007) (Raaijmakers et al.,2009). Así mismo, el número de ASVs fue mayor en el suelo rizosférico, indicando que hay mayor diversidad bacteriana en el área que circunda la raíz de la planta, siendo consistente con estudios previos, en los cuales la diversidad de microorganismos es mayor cerca al rizoplano, disminuyendo paulatinamente a medida que incrementa la distancia a la raíz (Dotaniya & Meena, 2015) (Kowalchuk et al., 2010).

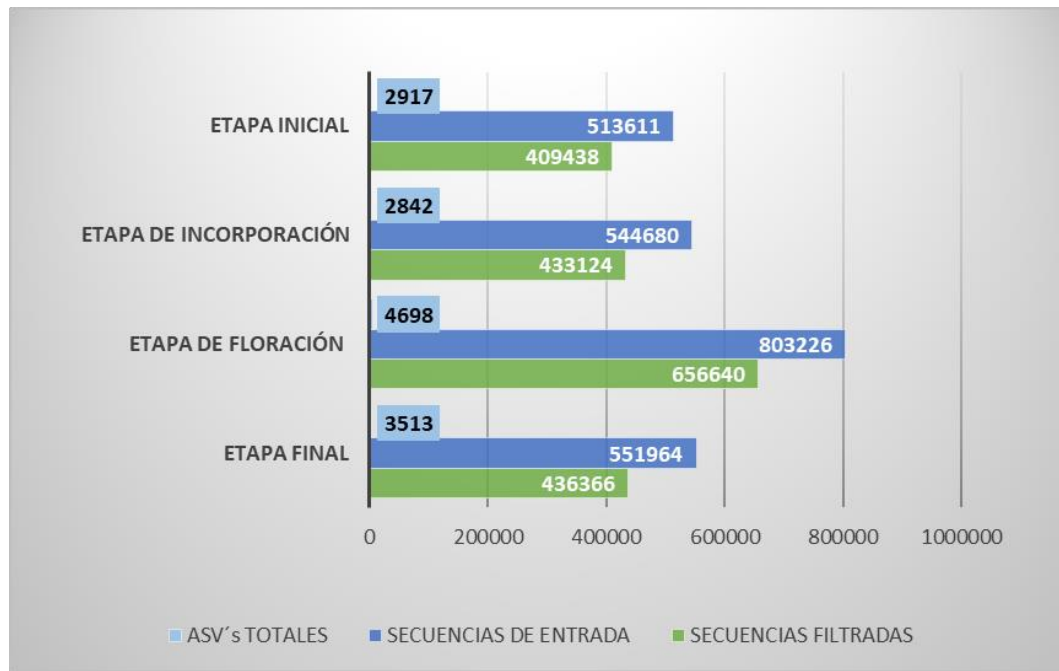


Figura 8 Número de secuencias crudas, secuencias filtradas de alta calidad y número de ASVs.

Los índices de diversidad alfa utilizados para evaluar el efecto de diferentes manejos del tamo de arroz sobre la comunidad edáfica, corresponden a la riqueza de especies o ASVs encontradas en cada tratamiento, el índice de Shannon y el índice de equitabilidad de Pielou. Los valores para cada uno de los índices evaluados se muestran en la Tabla 2. La riqueza de especies (número de ASVs) varió entre 625 y 979 para todas las muestras analizadas. Se observó un incremento consistente del número de ASVs durante la etapa de floración en los 4 tratamientos, indicando una mayor diversidad de la comunidad

bacteriana de la rizósfera, sin embargo no hubo diferencias significativas entre tratamientos para esta etapa ni para las etapas restantes ($p > 0,05$).

El índice de Shannon mostró que para las etapas inicial, de incorporación y final se obtuvieron resultados cercanos entre los tratamientos, sin diferencias significativas. Durante la etapa de floración el índice incrementó ligeramente en los tratamientos de cobertura con y sin microorganismos (COB+MO y COB) pero no hubo una diferencia entre los mismos ($p > 0,05$). El índice de equitabilidad de especies (Pielou) presentó valores similares entre tratamientos para todas las etapas de muestreo ($p > 0,05$), indicando que no hay una especie que domine sobre las demás (Anexo B).

Tabla 2 Resultados Índices de diversidad alfa para todas las etapas de muestreo.

ÍNDICES	ETAPA INICIAL							
	Cob + mo		Inc + mo		Quema		Cob	
RIQUEZA ESPÉCIFICA (# DE ASVs)	696	D.E. 7,1	649	D.E. 34,0	629	D.E. 9,3	625	D.E. 31,3
SHANNON	8,8	D.E. 0,02	8,7	D.E. 0,04	8,6	D.E. 0,09	8,7	D.E. 0,05
EQUIDAD (PIELOU)	0,94	D.E. 0,001	0,93	D.E. 0,004	0,93	D.E. 0,008	0,93	D.E. 0,003

ÍNDICES	ETAPA DE DEGRADACIÓN							
	Cob + mo		Inc + mo		Quema		Cob	
RIQUEZA ESPÉCIFICA (# DE ASVs)	656	D.E. 6,7	669	D.E. 29,1	708	D.E. 24,8	699	D.E. 41,3
SHANNON	8,7	D.E. 0,05	8,7	D.E. 0,04	8,8	D.E. 0,04	8,8	D.E. 0,11
EQUIDAD (PIELOU)	0,93	D.E. 0,005	0,93	D.E. 0,002	0,93	D.E. 0,001	0,93	D.E. 0,003

ÍNDICES	ETAPA FLORACIÓN							
	Cob + mo		Inc + mo		Quema		Cob	
RIQUEZA ESPÉCIFICA (# DE ASVs)	882	D.E. 11,9	822	D.E. 69,9	862	D.E. 20,7	979	D.E. 70,0
SHANNON	9,1	D.E. 0,09	8,8	D.E. 0,21	8,9	D.E. 0,12	9,2	D.E. 0,11
EQUIDAD (PIELOU)	0,93	D.E. 0,009	0,91	D.E. 0,012	0,92	D.E. 0,015	0,93	D.E. 0,003

ÍNDICES	ETAPA FINAL							
	Cob + mo		Inc + mo		Quema		Cob	
RIQUEZA ESPÉCIFICA (# DE ASVs)	806	D.E. 193,0	713	D.E. 38,4	732	D.E. 57,1	663	D.E. 30,1
SHANNON	8,9	D.E. 0,26	8,8	D.E. 0,04	8,8	D.E. 0,10	8,7	D.E. 0,05
EQUIDAD (PIELOU)	0,92	D.E. 0,005	0,93	D.E. 0,004	0,93	D.E. 0,003	0,93	D.E. 0,002

* Cob +m.o: tratamiento de cobertura del terreno con tamo de arroz inoculado con el consorcio de degradación; Inc+m.o: tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado con el consorcio de degradación; quema: tratamiento de quema y Cob: tratamiento de cobertura con tamo de arroz. Método estadístico: Kruskal-Wallis, realizando una corrección de tipo Benjamin-Hochberg. ($q < 0,05$)

El índice de diversidad beta escogido para comparar cuantitativamente la disimilaridad entre comunidades considerando la composición de especies y su abundancia fue el índice de Bray Curtis cuyas distancias se representan en el gráfico de coordenadas principales de escalamiento multidimensional PCoA (Fig. 9) , en el cual se observan algunos patrones de agrupación, en la etapa inicial (separación de las parcelas del COB+MO) y en la etapa final (se agrupan todos los tratamientos), sin embargo los resultados estadísticos confirman que no existen diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las etapas muestreadas. (PERMANOVA $q > 0,05$) (Anexo C).

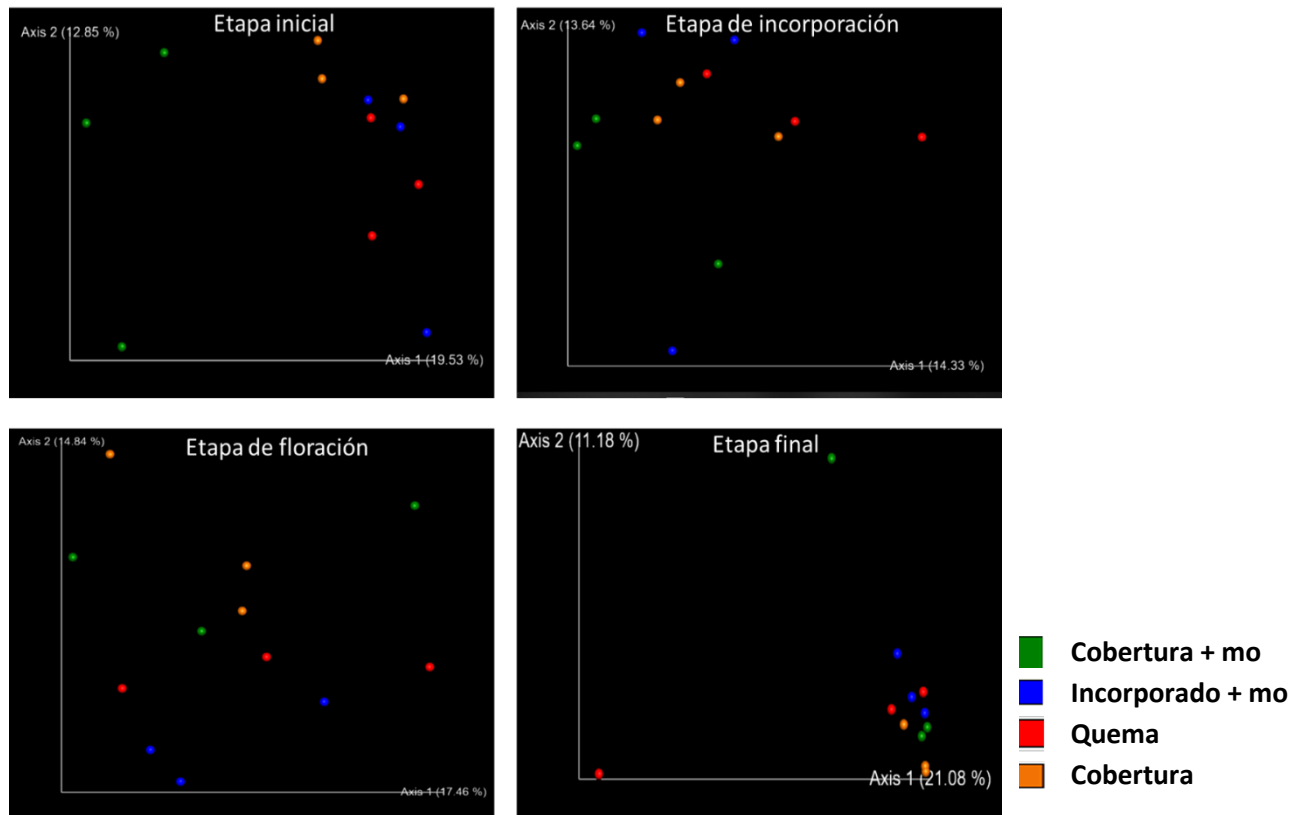


Figura 9 Gráfico de coordenadas principales de escalamiento multidimensional (PCoA) de la diversidad beta basado en las distancias de disimilitud de índice de Bray Curtis para cada una de las etapas muestreadas.

* Método estadístico: análisis permutacional multivariado (PERMANOVA $q < 0,05$) realizando una corrección de tipo Benjamin-Hochberg.

Con base en lo anterior, se determina que las métricas de diversidad alfa y beta no fueron afectadas por los diferentes manejos del tamo de arroz en ninguna de las etapas muestreadas. Estos mismos resultados han sido obtenidos en investigaciones previas, mostrando que la aplicación de tamo de arroz en el suelo genera un efecto muy leve sobre la diversidad y los cambios composicionales de la comunidad de bacterias en comparación con otros factores a corto plazo (Maarastawi et al., 2018). Al evaluar la diversidad de comunidades de hongos y de bacterias en suelos de soporte proveniente de un cultivo de arroz adicionado con tamo, Li y colaboradores en 2018 no encontraron diferencias en ninguno de los índices de diversidad analizados para la comunidad de bacterias en comparación con los tratamientos control, lo cual fue vinculado a que la comunidad de

hongos predominaba sobre la de bacterias de acuerdo a la proporción encontrada durante el proceso de descomposición del tamo (Li et al., 2018). Lo anterior puede ser posible en ecosistemas altamente diversos, en los que una alta tasa de recambio de especies no permite hallar con facilidad los efectos que ocurren sobre la comunidad microbiana en términos de diversidad.

Con el fin de identificar otros factores que pudieran influir sobre la diversidad de la comunidad de microorganismos, se combinaron las muestras de las etapas inicial, incorporación y final de los cuatro tratamientos, considerando que tienen la misma naturaleza -suelo de soporte- y que el proceso de calidad de las secuencias fue uniforme. Se evaluaron tanto el efecto del tratamiento así como el de la etapa de muestreo. En primera instancia, utilizando la distancia de Bray Curtis, se generó un gráfico de coordenadas principales de escalamiento multidimensional PCoA, etiquetando las muestras por tratamiento, sin embargo no se evidenció ninguna agrupación particular (Fig. 10).

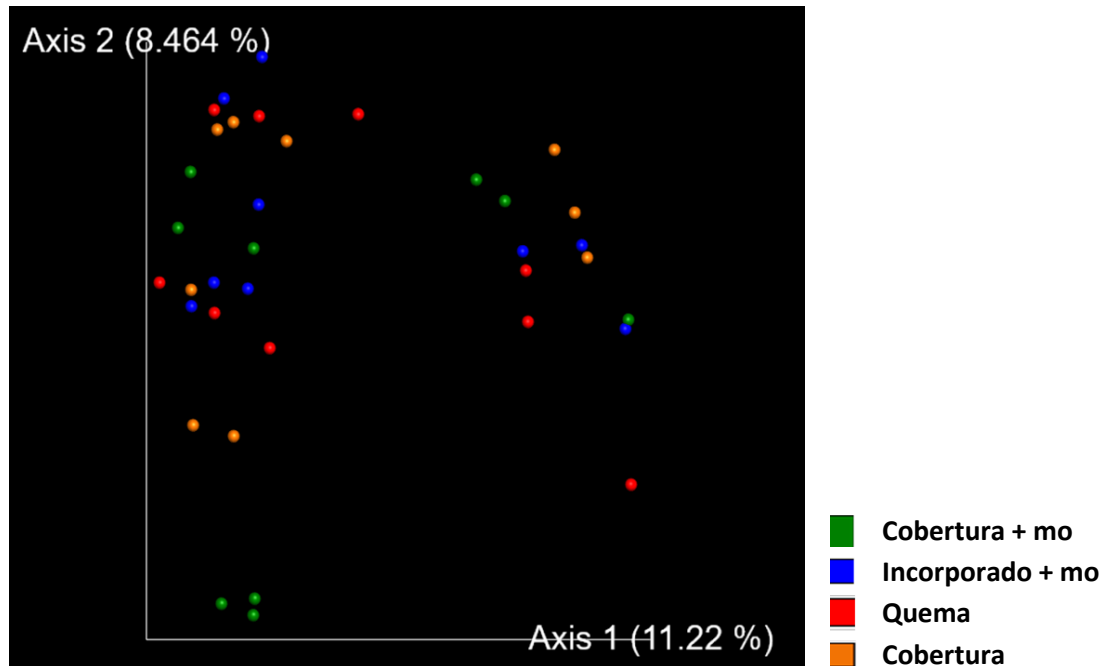


Figura 10 Distancia de Bray Curtis para todas las muestras de los tratamientos considerando todas las etapas de muestreo

* Método estadístico: análisis permutacional multivariado (PERMANOVA $q < 0,05$) realizando una corrección de tipo Benjamin-Hochberg.

El mismo set de datos correspondiente a la totalidad de las muestras, fue graficado e identificado de acuerdo a la etapa de recolección, observando que las distancias de Bray Curtis eran menores entre las muestras de una misma etapa, las cuales se agrupaban sin que se pudieran distinguir los tratamientos aplicados en cada una de ellas, lo cual conlleva a pensar que la diversidad beta de la comunidad microbiana es mayormente influenciada por las condiciones del suelo en un momento dado (Fig. 11), las cuales responden a factores ambientales diferentes a los determinados por los tratamientos, como por ejemplo los disturbios asociados al cultivo de arroz propiamente dicho, la etapa fenológica del cultivo, la aplicación de fertilizantes e insumos de manejo de plagas y enfermedades, la disponibilidad de agua y de nutrientes entre otros, que fueron comunes para todos los tratamientos en este estudio (Luo et al., 2016). Por ejemplo, Pittol et al., encontraron que

los cambios en la estructura de la comunidad microbiana en campos de arroz bajo inundación eran regidos principalmente por factores medioambientales del suelo, considerando una compleja red de elementos (aplicación de fertilizantes, las condiciones climáticas, el tipo de cultivo) que intervienen en la conformación de la estructura de la comunidad edáfica (Pittol et al., 2018).

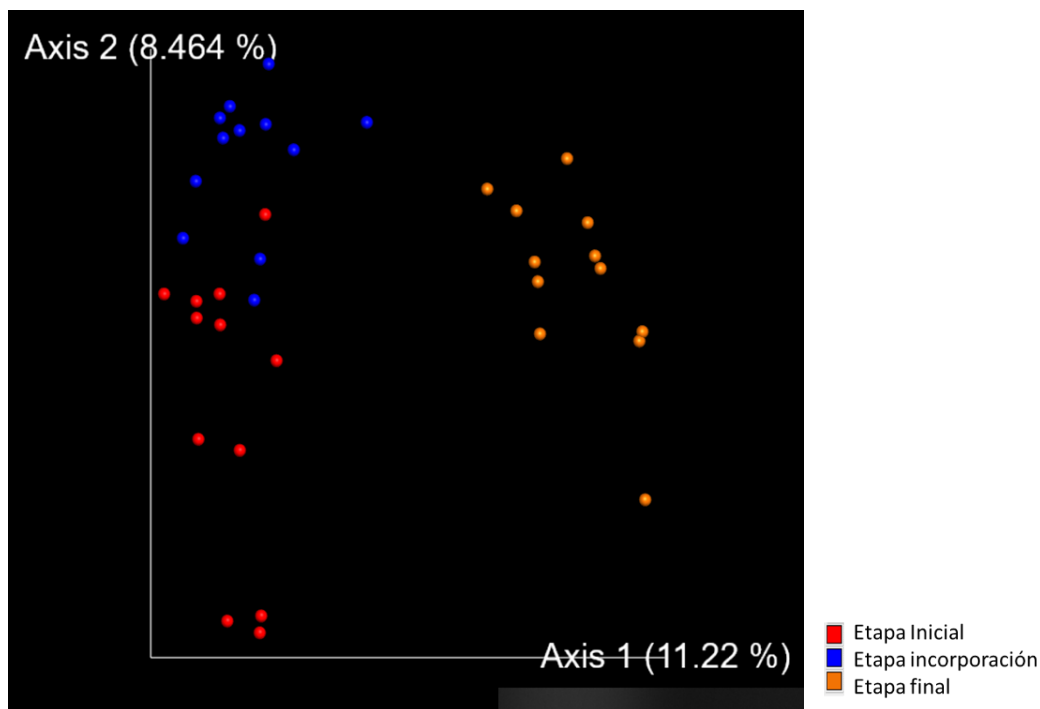


Figura 11 Distancia de Bray Curtis colapsando las muestras de los cuatro tratamientos de acuerdo a la etapa de muestreo.

*Método estadístico: análisis permutacional multivariado (PERMANOVA $q < 0,05$) realizando una corrección de tipo Benjamin-Hochberg.

Posteriormente, las secuencias de alta calidad de cada una de las etapas de muestreo fueron asignadas taxonómicamente con la base de datos SILVA 128 y clasificadas a diferentes niveles taxonómicos.

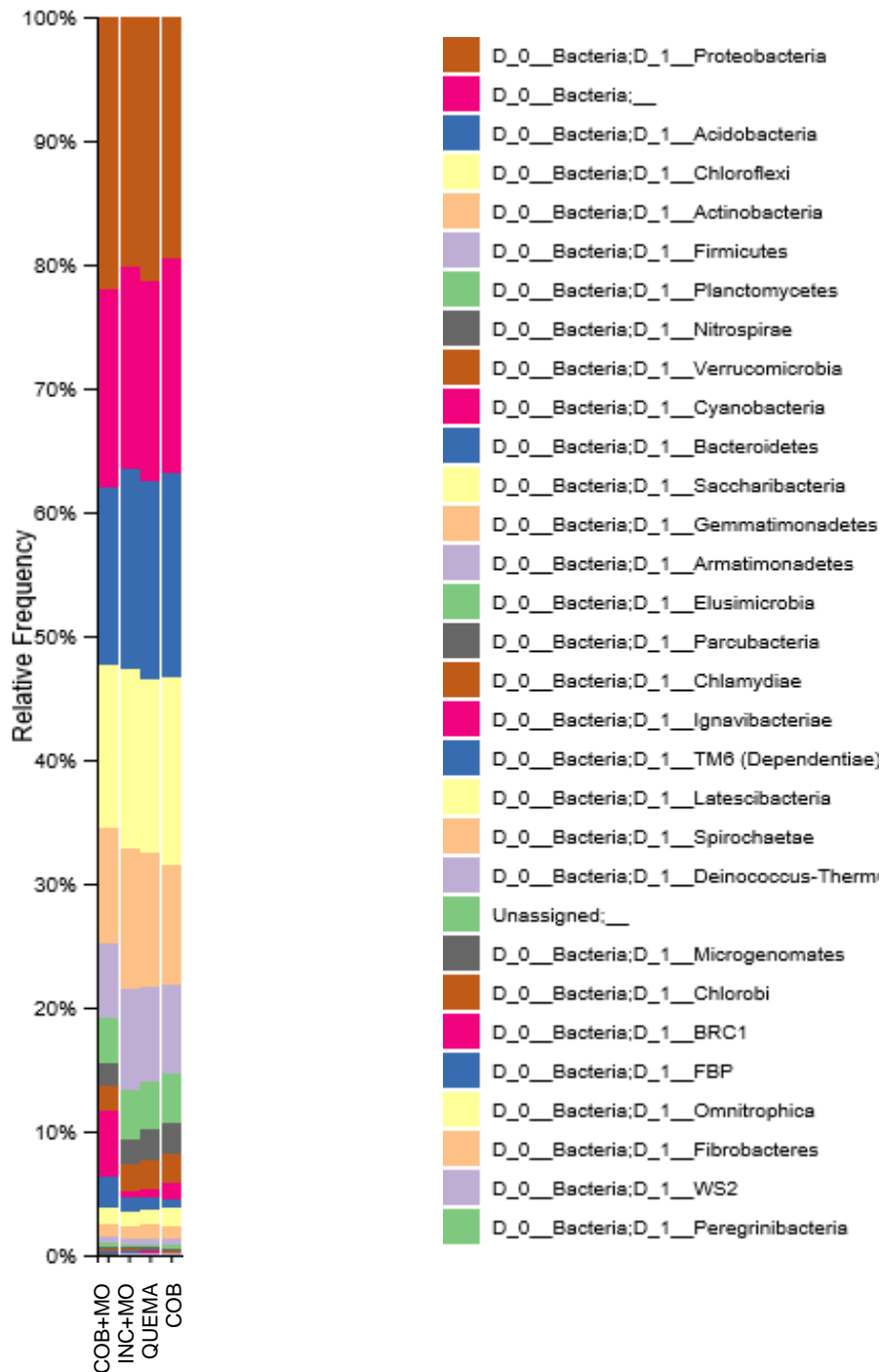


Figura 12 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa inicial.

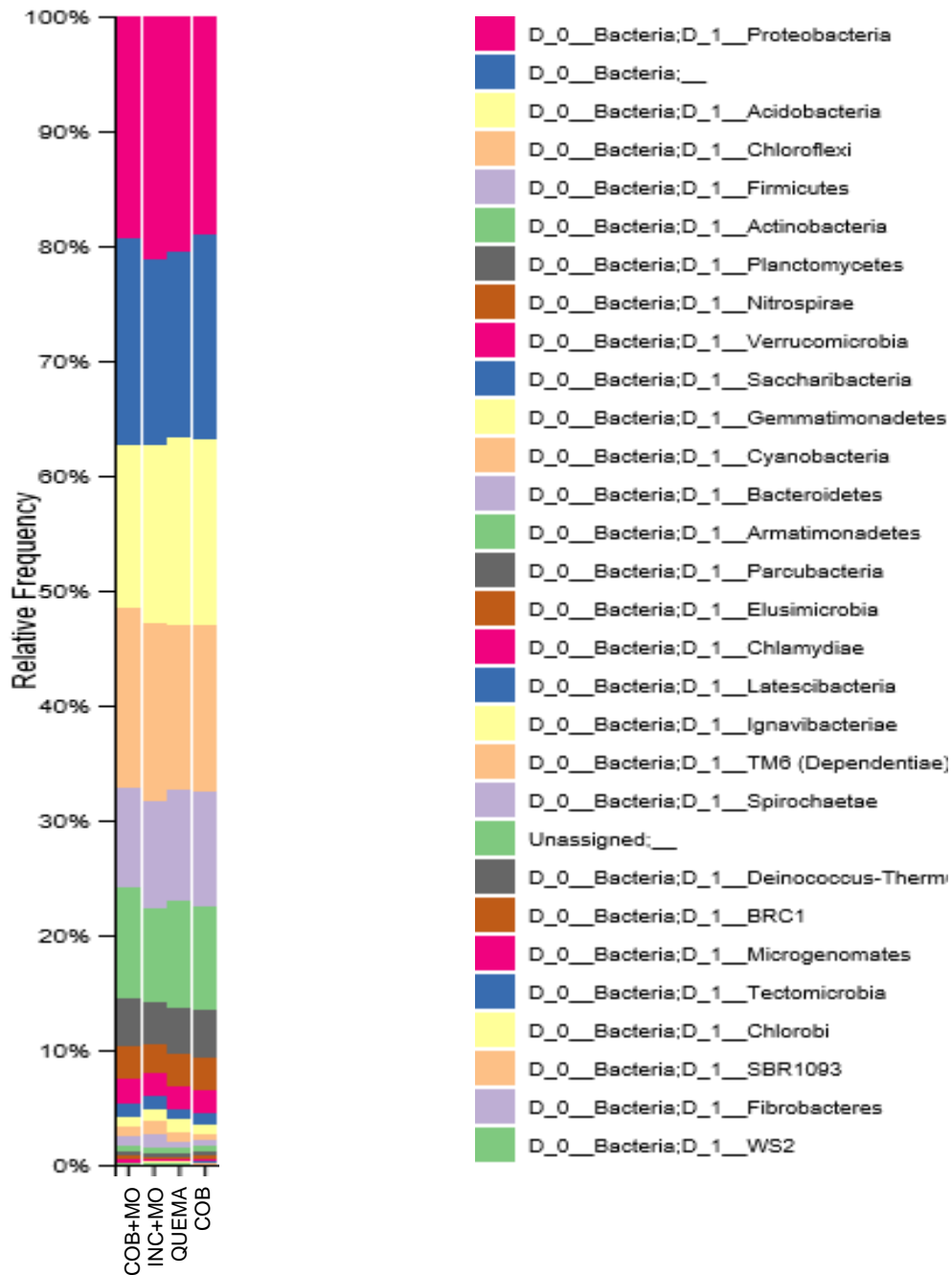


Figura 13 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa de incorporación

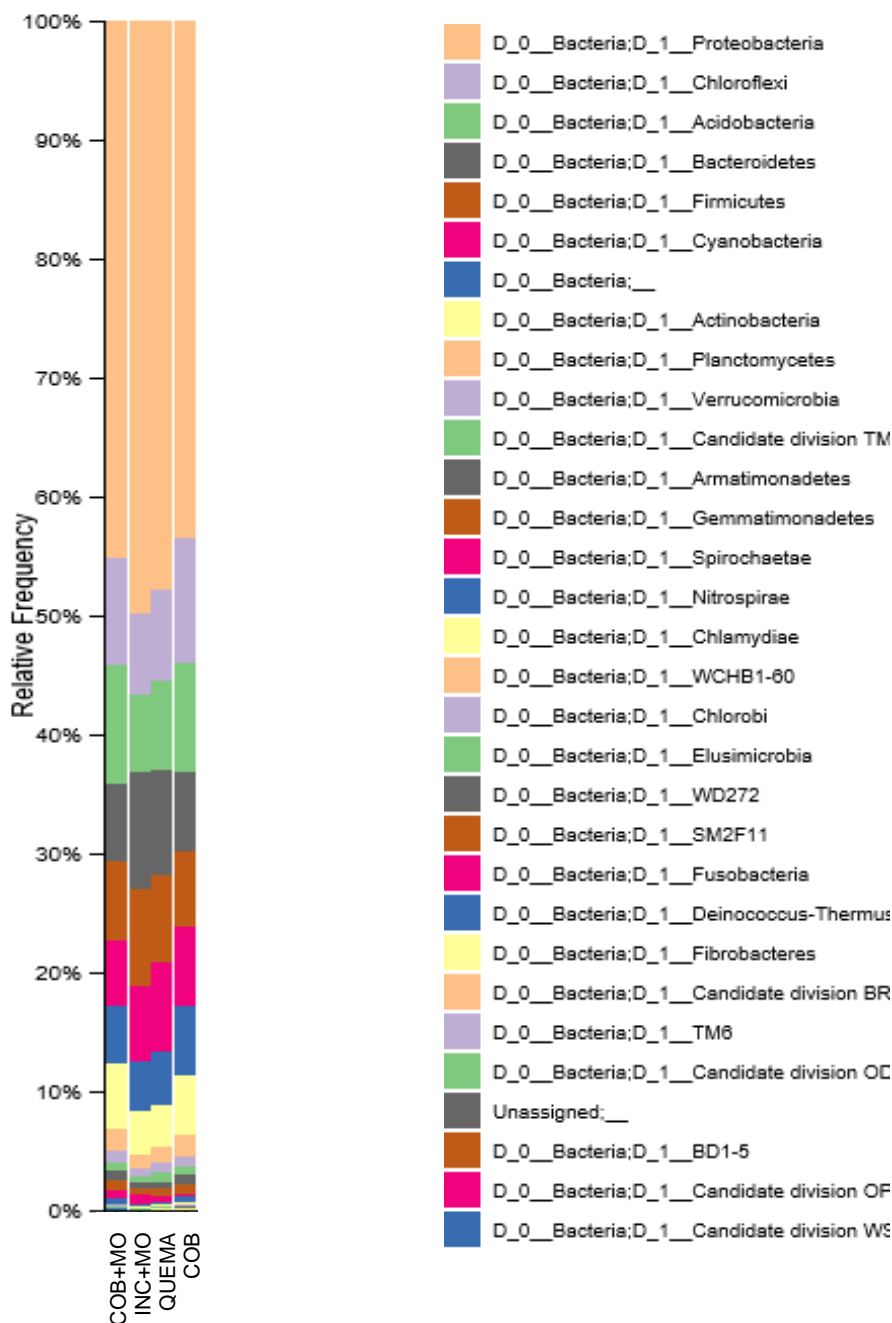


Figura 14 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa floración

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo. Se muestran las abundancias relativas promedio de muestras en triplicado para cada tratamiento.

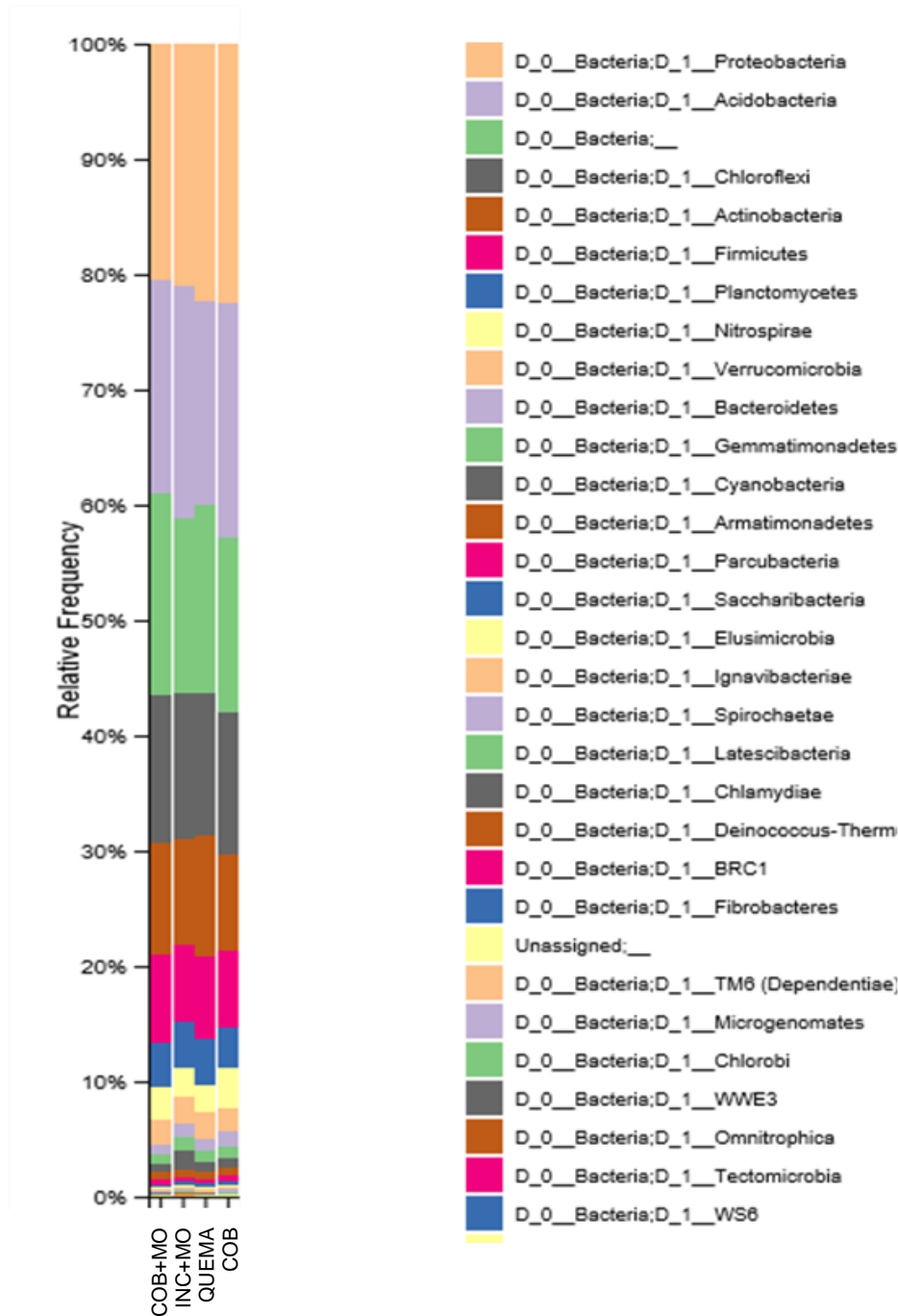


Figura 15 Abundancias relativas a nivel de filum de los diferentes tratamientos de manejo del tamo de arroz. Etapa final.

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo. Se muestran las abundancias relativas promedio de muestras en triplicado para cada tratamiento.

Se observó que de manera general, para todas las muestras predominaban los filums Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Firmicutes y Planctomycetes que han sido encontrados como los de mayor frecuencia en otros estudios ecológicos de suelos de cultivo de arroz (Wu, Qin, Chen, Wu, & Wei, 2011) (Edwards et al., 2015) (Maarastawi et al., 2018) (Pittol et al., 2018).

El filum predominante a lo largo de la cronosecuencia de los diferentes tratamientos fue Proteobacteria, el cual contiene taxones previamente identificados como importantes colonizadores de arrozales por la plasticidad que poseen para descomponer diversas fuentes de materia orgánica, (Breidenbach & Conrad, 2015) (Wang et al., 2017) (Yi et al., 2018). Para este filum se obtuvo una abundancia relativa promedio de 20,75% en la etapa inicial, 20,02% en la etapa de incorporación, 46,62% en la etapa de floración y 21,55% en la etapa final.

Para la etapa inicial de muestreo, las frecuencias relativas de los filums identificados son semejantes entre tratamientos (Fig. 12). Dado que durante esta etapa no había iniciado la aplicación de los manejos, podría considerarse una representación de la comunidad microbiana nativa con variaciones naturales entre muestras. Los filums encontrados en esta etapa de muestreo fueron Proteobacteria (~20,74%), Acidobacteria (~15,76%), Chloroflexi (~14,18%), Actinobacteria (~10,19%) y Firmicutes (~7,3%) representando alrededor del 70% de las secuencias.

Durante la segunda etapa de muestreo (incorporación) los filums más abundantes fueron los mismos encontrados en la primera etapa, con ligeros cambios en sus abundancias: Proteobacteria (~20%), Acidobacteria (~15,5%), Chloroflexi (~15,05%), Firmicutes (~9,4%) y Actinobacteria (9,02%) (Fig. 13). El filum Acidobacteria, asociado a ambientes con bajas disponibilidades de sustrato (Bernard et al., 2007) (Naether et al., 2012), fue más abundante en los tratamientos de quema y cobertura sin inóculo. El filum Chloroflexi fue ligeramente más abundante en las muestras de los tratamientos de cobertura e incorporación inoculados con el consorcio, lo cual puede estar vinculado con los procesos de degradación potenciados por el consorcio microbiano, que promueven el crecimiento de bacterias afiliadas al filum Chloroflexi y que podrían trabajar en conjunto como degradadores primarios de los polisacáridos encontrados en el tamo de arroz (Ahn et al., 2012).

Durante la etapa de floración en la que fue muestreado suelo rizosférico, es evidente un incremento en la frecuencia relativa del filum Proteobacteria en comparación a las demás etapas de muestreo, representando en promedio un 46,65% del total de secuencias asignadas (Fig. 14). Lo anterior demuestra que las comunidades microbianas responden al efecto rizosférico, el cual promueve una mayor tasa de crecimiento de los taxones dentro del filum Proteobacteria debido a la habilidad que poseen para responder a fuentes lábiles de carbono provenientes de los exudados radiculares (microorganismos copiotrofos) (Lagos et al., 2015). Así mismo puede ser posible la dominación de géneros asociados a este filum debido a una mayor disponibilidad de oxígeno cerca de la raíz de la planta (Lüdemann, Arth, & Liesack, 2000). El tratamiento de incorporación inoculado con el consorcio fue el que presentó una mayor abundancia de Proteobacterias (COB+MO: 45,21%; INC+MO: 49,90%; QUEMA: 47,90%; COB: 43,48%), posiblemente por una mayor disponibilidad de fuentes lábiles de carbono. Los tratamientos de cobertura con y sin inóculo (COB+MO y COB) tuvieron una mayor proporción de los filums Acidobacteria y Actinobacteria, caracterizados por su capacidad para degradar componentes recalcitrantes de las plantas como la celulosa y lignina, respondiendo a un proceso de descomposición tardío del tamo dejado en cobertura en comparación a los tratamientos que fueron

incorporados al suelo (INC+MO y QUEMA) (Bernard et al., 2007) (Ward et al., 2009) (Zhan et al., 2018).

Para la etapa final (Fig. 15), se observó que el fílum Acidobacteria era más abundante en los tratamientos alternos a la quema, lo cual puede ser explicado por el aumento del pH del suelo como consecuencia de la liberación de calcio y magnesio a partir de las cenizas provenientes de la quema del tamo, inhibiendo así el crecimiento de microorganismos acidófilos (Ogbodo, 2011). A nivel de orden, se siguió observando el patrón encontrado para los Acidobacteriales, siendo más abundantes en los tratamientos de cobertura con y sin inóculo y en el tratamiento de incorporación inoculado. También se evidenció un ligero incremento en la abundancia del orden Rhizobiales para el tratamiento de incorporación inoculado con el consorcio.

No hubo diferencias entre tratamientos al comparar las abundancias relativas a nivel de fílum por lo cual, usando la información taxonómica de las secuencias asignadas con la base de datos SILVA 128, se realizaron dendogramas para estimar la similitud entre las comunidades microbianas de los diferentes manejos del tamo de arroz. Basados en agrupamientos jerárquicos utilizando la distancia de Bray Curtis, se denotó para la etapa inicial, una agrupación de las parcelas asignadas al tratamiento 1 que corresponde a la cobertura con tamo de arroz inoculado con el consorcio microbiano (Anexo D). Esta es una variable no podía ser controlada dadas las condiciones del experimento y que hace parte de la variación innata del suelo (Adamchuk, Ferguson, & Hergert, 2010). Los resultados de los dendogramas de las etapas de incorporación y final no mostraron una agrupación consistente que respondiera a algún factor específico (Anexo D), indicando que a nivel de fílum no se generan agrupaciones determinadas por los tratamientos cuando se compara el *pangenoma* (todo el repertorio de genes/especies en un grupo de estudio) (Medini et al., 2005). Únicamente para la etapa de floración se pudo observar una clara distinción de los

tratamientos de cobertura con y sin microorganismos (COB+MO y COB) de los de incorporación con inóculo y quema (INC+MO y QUEMA) (Fig 16).

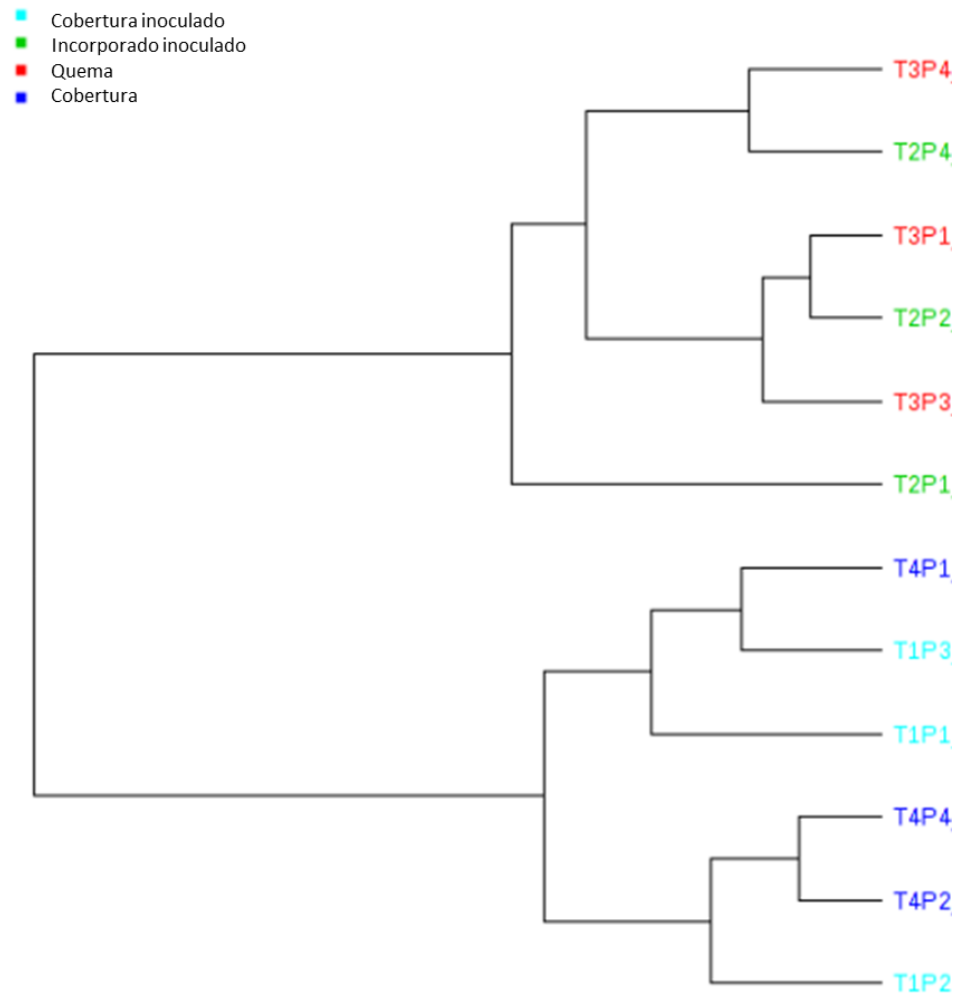


Figura 16 Dendrograma a nivel de filum de la etapa de floración.

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento cobertura del terreno con tamo. Las letras P1-P3 representan cada una de las parcelas del tratamiento muestreadas

De lo anterior se deduce que el tratamiento del tamo aparentemente no ejerce un efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo de soporte antes ni durante el ciclo de cultivo de arroz, pero sí ejerce un efecto sobre el microbioma rizosférico en las plantas de arroz. En este contexto, al evidenciarse la agrupación diferencial por una parte para los tratamientos incorporados (INC+MO y QUEMA) y por otra parte para los tratamientos de cobertura con y sin inoculo (COB+MO y COB), se puede llegar a concluir que cubrir el terreno con tamo de arroz proporciona condiciones particulares sobre las propiedades físicas y químicas del suelo que afectan la comunidad microbiana de la rizósfera, seguramente como consecuencia de una tasa de descomposición diferente, ya que los tratamientos de incorporación y quema fueron integrados previamente al suelo (Ferreira & Martin-Didonet, 2012). La anterior explicación es soportada en los resultados de abundancias relativas de los filums Acidobacteria y Actinobacteria encontrados en esta etapa de muestreo en los tratamientos de cobertura con y sin inóculo (COB+MO y COB), caracterizándose por la degradación de matrices recalcitrantes como el tamo de arroz (Bernard et al., 2007) (Zhan et al., 2018). Al igual que lo encontrado en los resultados de riqueza de especies, el dendograma de la etapa de floración hace notar que las respuestas de la comunidad bacteriana son más evidentes en el suelo rizosférico que en el suelo de soporte, en este caso permitiendo observar un efecto de tratamiento, a pesar de que la comunidad microbiana en esta zona es principalmente influenciada por los exudados de la planta (Bulgarelli, et al., 2013). En el caso anteriormente planteado, la disponibilidad de compuestos fácilmente asimilables provenientes de la rizodeposición puede estimular la degradación del tamo de arroz que fue dejado en cobertura, mientras que probablemente el tamo de arroz incorporado desde el inicio puede encontrarse en una instancia más avanzada de descomposición.

Efectos de los diferentes tratamientos de tamo sobre la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno

A continuación, se compararon las abundancias relativas entre tratamientos de las principales familias de microorganismos relacionadas al ciclo del nitrógeno para cada una de las etapas de muestreo.

En la etapa inicial se obtuvieron las siguientes abundancias para las familias *Bacillaceae* (COB+MO: 2,27%, INC+MO: 2,99%, QUEMA: 2,99%, 2,54%), Nitrospiraceae (COB+MO: 1,22%; INC+MO: 1,37%; QUEMA: 1,50%; COB: 1,65%), Bradyrhizobiaceae (COB+MO:1,19%; INC+MO: 1,43%; QUEMA: 1,70%; COB: 1,32%) y Nitrosomonadaceae (COB+MO: 0,94%; INC+MO: 1,15%; QUEMA: 1,32%; COB: 1,08%) (Fig. 17). Al igual que los resultados de las abundancias relativas generales, descritas a nivel de fílum en párrafos anteriores, las principales familias bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno para la etapa inicial de muestreo tuvieron abundancias bastante homogéneas entre tratamientos. Se denota una leve disminución de las abundancias de las familias representadas en el COB+MO.

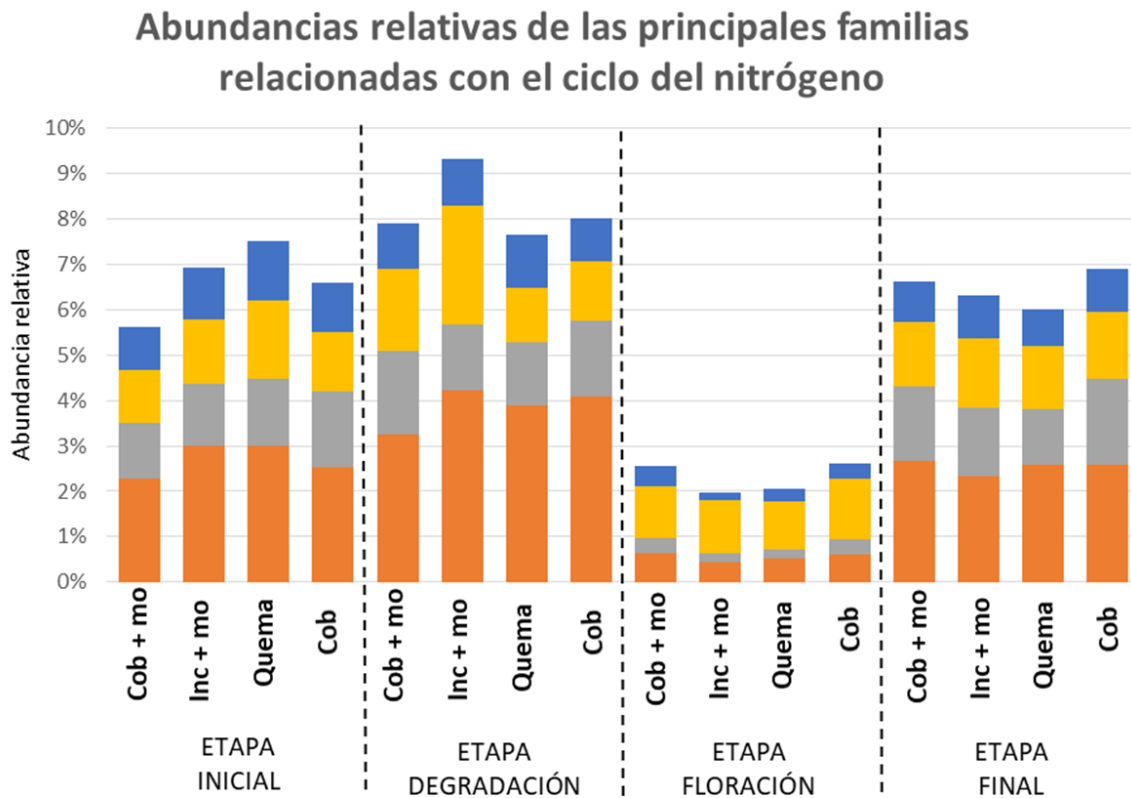


Figura 17 Abundancias relativas de las principales familias bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema

del tamo. COB: Tratamiento cobertura del terreno con tamo. *Método estadístico: Kruskal Wallis, con corrección de Bonferroni. $p < 0,05$.

Para la etapa de incorporación, las abundancias de estas mismas familias fueron: Bacillaceae (COB+MO: 3,25%; INC+MO: 4,22%; QUEMA: 3,89 y 4,08%), Bradyrhizobiaceae (COB+MO: 1,81%; INC+MO: 2,62%; QUEMA: 1,20%; COB: 1,29%), Nitrospiraceae (COB+MO: 1,83%; INC+MO: 1,45%; QUEMA: 1,40%; COB: 1,69%), Nitrosomadaceae (COB+MO: 1,02%; INC+MO: 1,02%; QUEMA: 1,16%; COB: 0,94%) (Fig.17), observando un aumento general de la familia Bacillaceae en todos los tratamientos. Para el tratamiento de incorporación inoculado (INC+MO) se observa un leve incremento en la abundancia de la familia Bradyrhizobiaceae, la cual incluye géneros reconocidos por participar en procesos de fijación biológica del nitrógeno (*Bradyrhizobium*), mineralización (*Nitrobacter*), reducción de nitrato (*Salinarimonas* y *Tardiphaga*) y desnitrificación (*Bosea* y *Blastobacter*) (Marcondes et al., 2014). Cabe mencionar que este tratamiento tuvo mayores abundancias del fílum Proteobacteria, lo cual puede ser consecuencia de un mayor contenido de carbono que serviría como fuente energética para los procesos de fijación (Latt et al., 2018), además de haber otros compuestos nitrogenados disponibles provenientes de la mineralización.

Para la etapa de floración, se observó una disminución significativa en las abundancias de estas mismas familias (Fig. 17): Bradyrhizobiaceae (COB+MO: 1,15%; INC+MO: 1,17%; QUEMA: 1,04%; COB: 1,34%), Bacillaceae (COB+MO: 0,64%; INC+MO: 0,44%; QUEMA: 0,53%; COB: 0,62%), Nitrosomonadaceae (COB+MO: 0,44%; INC+MO: 0,18%; QUEMA: 0,28%; COB: 0,32%) y Nitrospiraceae (COB+MO: 0,33%; INC+MO: 0,19%; QUEMA: 0,20%; COB: 0,32%). Estos resultados se pueden relacionar con la disponibilidad de carbono en la rizósfera, lo cual genera un crecimiento mayor de otros taxones no relacionados con el

ciclo del nitrógeno, como por ejemplo los pertenecientes a las familias Rhodocyclaceae (la más abundante en esta etapa) y Comamonadaceae, reconocidas por llevar a cabo procesos de ciclaje del carbono y de participar activamente en la degradación de biopolímeros derivados de las plantas (Gardner et al., 2011) (Zhan et al., 2018). A pesar de lo anterior, no se puede descartar la posibilidad de que miembros dentro de estas u otras familias diferentes a las seleccionadas realicen procesos involucrados en la transformación del nitrógeno, por ejemplo algunas especies de la familia Rhodocyclaceae son capaces de fijar nitrógeno bajo condiciones de microaerobiosis (Oren, 2014) y algunos géneros de la familia Comamonadaceae (*Comamonas*, *Aquabacterium*, *Caenimonas* presentes en las muestras del experimento), llevan a cabo procesos de fijación, de oxidación de amonio, nitrificación y desnitrificación (Willems, 2014) pero en términos genéricos estas familias no han sido referenciadas como representantes de procesos dentro del ciclo del nitrógeno.

Para la etapa final de muestreo las familias seleccionadas tuvieron las siguientes abundancias relativas (Fig. 17): Bacillaceae (COB+MO: 2,67 %; INC+MO: 2,33%; QUEMA: 2,57%; COB: 2,59%), Nitrospiraceae (COB+MO: 1,63%; INC+MO: 1,50%; 1,25%; 1,88%), Bradyrhizobiaceae (COB+MO: 1,42%; INC+MO: 1,55%; QUEMA: 1,38%; 1,49%) y Nitrosomonadaceae (COB+MO: 0,89%; INC+MO: 0,94%, QUEMA: 0,81%; COB: 0,93%). Para esta etapa se observa que las abundancias relativas de las familias vinculadas al ciclo del nitrógeno son más homogéneas entre tratamientos.

Las 4 familias bacterianas seleccionadas, que han sido referenciadas en literatura con el ciclo del nitrógeno, fueron muy consistentes entre las etapas inicial, incorporación y final, las cuales pertenecían a suelo de soporte sin presentar diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$). La familia Bacillaceae, fue la que tuvo mayor abundancia durante las tres etapas, contemplando géneros saprófitos que realizan el ciclaje de materia orgánica, así como taxones que participan activamente en el ciclo del nitrógeno (mineralización, fijación y desnitrificación) en hábitats naturales como el suelo (Mandic-

Mulec, Stefanic, & van Elsas, 2015). Con el fin de identificar otras familias microbianas que pudieran generar cambios en la comunidad microbiana, se graficaron mapas de calor usando las abundancias relativas de las familias compartidas entre los tratamientos (*coregenoma*) y se realizaron agrupamientos jerárquicos basados en la distancia de disimilitud de Bray Curtis. Los mapas de calor de cada uno de los tiempos se muestran a continuación:

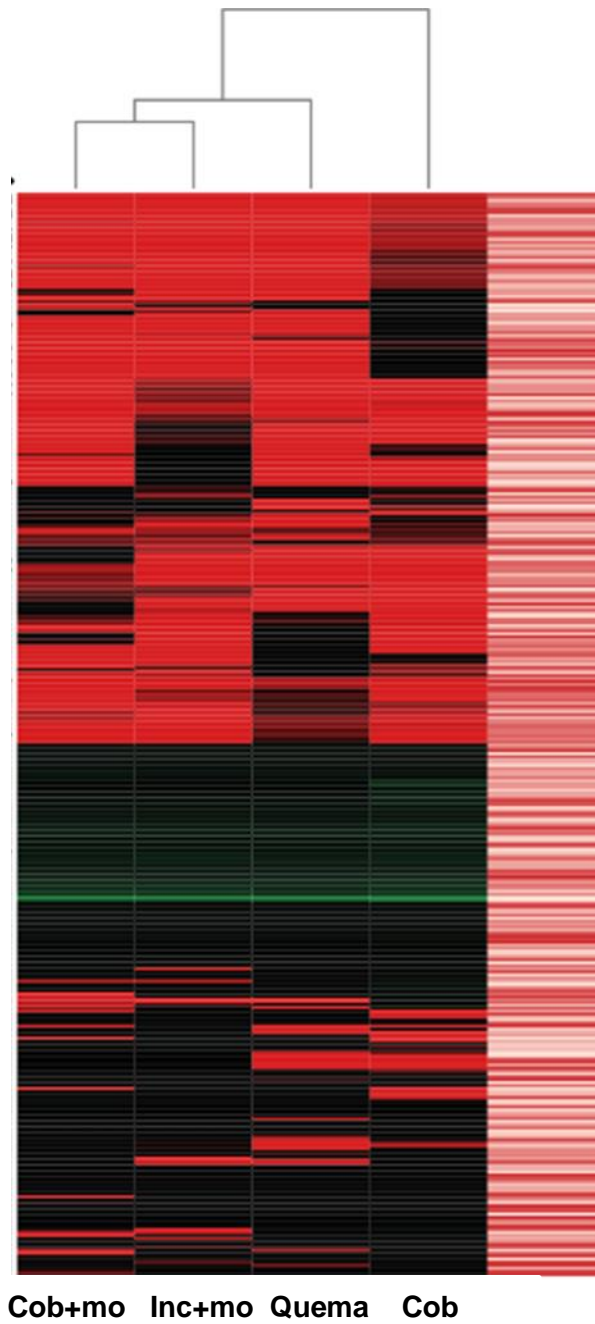


Figura 18 Mapa de calor. Etapa inicial

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.

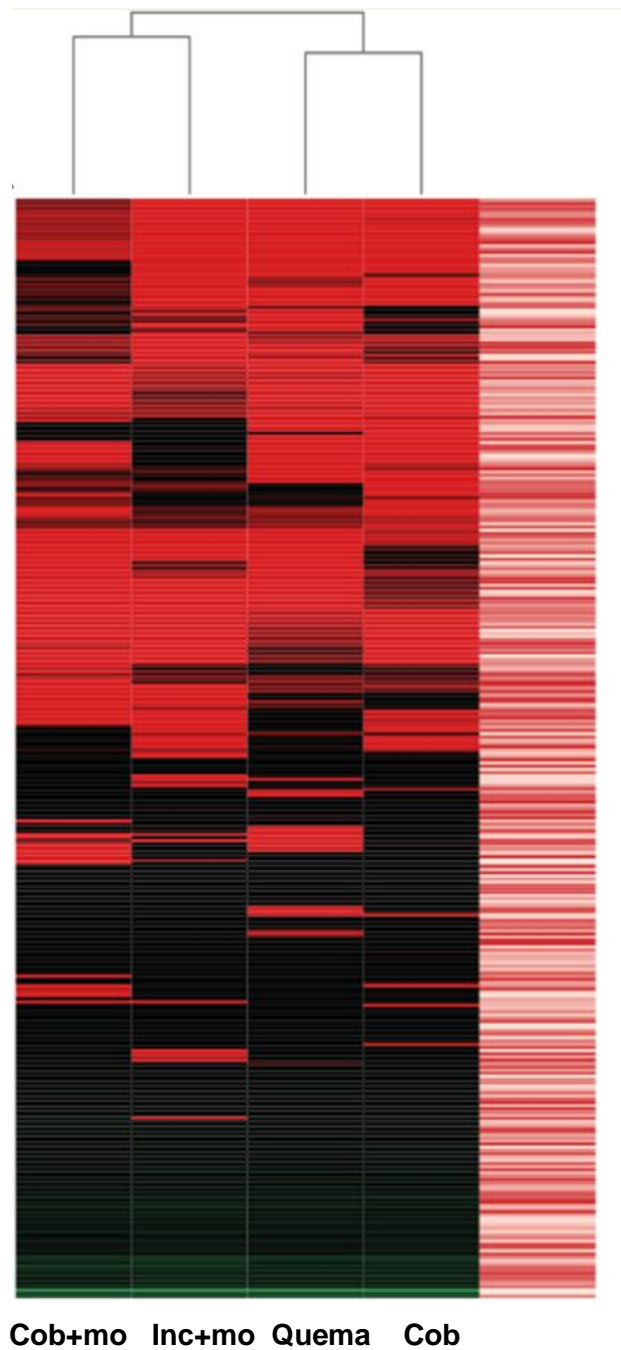


Figura 19 Mapa de calor. Etapa incorporación

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo

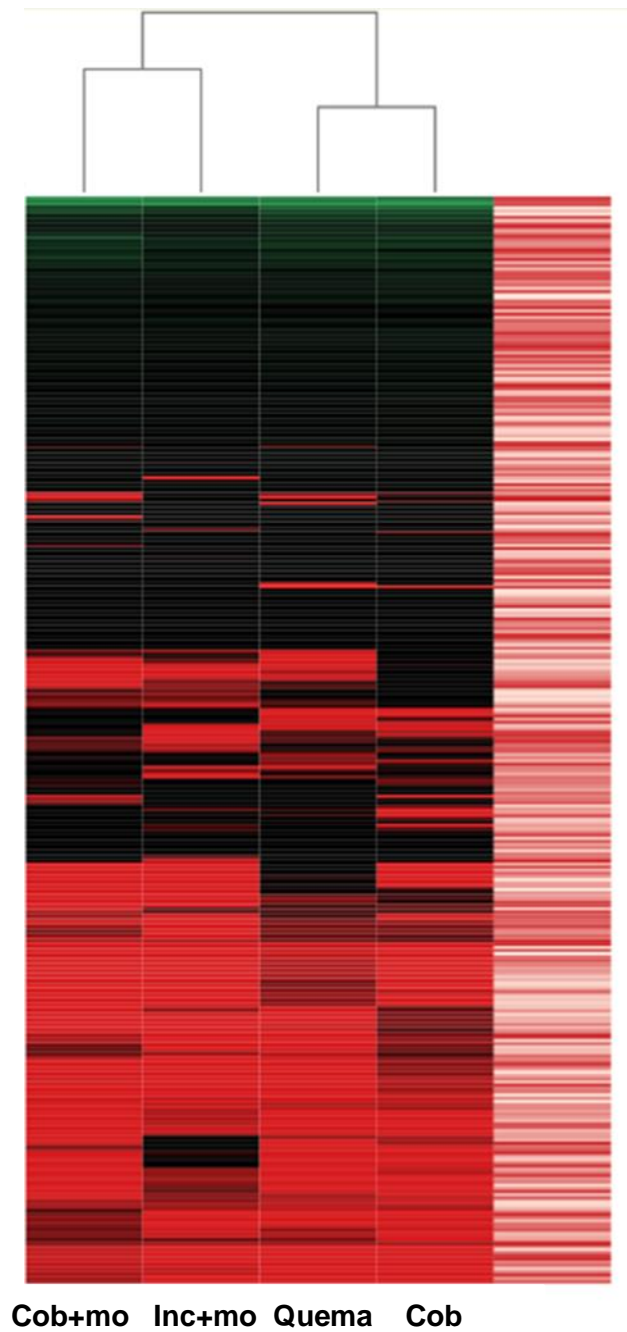


Figura 20 Mapa de calor. Etapa de floración

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo

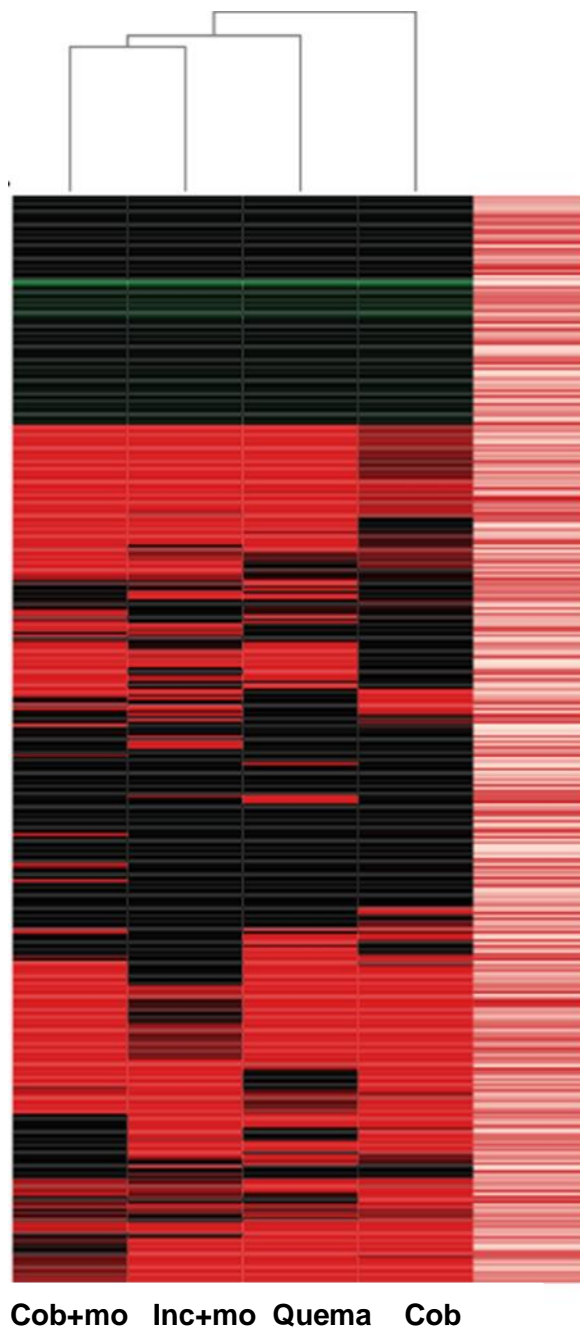


Figura 21 Mapa de calor Etapa final

COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.

En la etapa inicial, el suelo seleccionado para el (COB+MO) fue separado de los demás (Fig.18), corroborando la heterogeneidad de las condiciones que puede tener el suelo por factores ambientales, por disturbios previos o características físico-químicas. Para el período de incorporación se denota una clara agrupación de los tratamientos inoculados con microorganismos (COB+MO y INC+MO) de los que no (QUEMA y COB) (Fig. 19) suponiendo un efecto de la aplicación del consorcio microbiano sobre la estructura de la comunidad, en función de la actividad degradativa que cumplen los microorganismos en los primeros días de tratamiento. El mapa de calor de la etapa de floración fue consistente con el resultado obtenido en los agrupamientos jerárquicos del dendograma (pangenoma), separando los tratamientos incorporados (INC+MO y QUEMA) de los de cobertura (COB+MO y COB) (Fig. 120). Teniendo en cuenta lo anterior, se fortalece la idea anteriormente planteada de que cubrir el terreno con tamo de arroz o incorporarlo genera un efecto diferencial sobre la composición de la comunidad de microorganismos en la rizósfera, presentándose tanto al analizar el pangenoma como el coregenoma, a pesar de que variables como la fertilización, la lámina de agua, los exudados radiculares y el cultivo pueden homogenizar las comunidades bacterianas en este punto de muestreo (Zhan et al., 2018). Para la etapa final, se agrupan en un solo clado los tratamientos alternos de manejo del tamo (COB+MO, INC+MO y COB) y en otro clado se encuentra el tratamiento de quema (Fig. 21). Este hallazgo puede indicar que el contenido de materia orgánica es un factor determinante a mediano y posiblemente a largo plazo para la conformación de la comunidad edáfica microbiana, lo que a su vez puede resultar en el incremento de carbón, la capacidad de retención de agua y la estabilización del pH (García-Orenes et al., 2013). Adicionalmente se observa que los tratamientos inoculados con el consorcio de degradación se agrupan más cercanamente en el mapa de calor, de acuerdo a los taxones que comparten y sus abundancias, es decir que además del efecto de la adición de materia orgánica, la inoculación con microorganismos con potencial degradativo también influencia la composición y estructura de la comunidad bacteriana. Cabe resaltar que a pesar de ser la primera aplicación de los tratamientos, se observan agrupaciones que coinciden con lo

descrito en estudios similares a largo plazo (COB+MO, INC+MO y COB) (Wu et al., 2011).

Predicción funcional de los microorganismos asociados al ciclo del nitrógeno

Se realizaron predicciones funcionales a partir de los datos taxonómicos obtenidos del análisis del gen 16S rRNA utilizando la herramienta PICRUST v 13.5. Los resultados de las secuencias relacionadas con el metabolismo del nitrógeno se muestran a continuación:

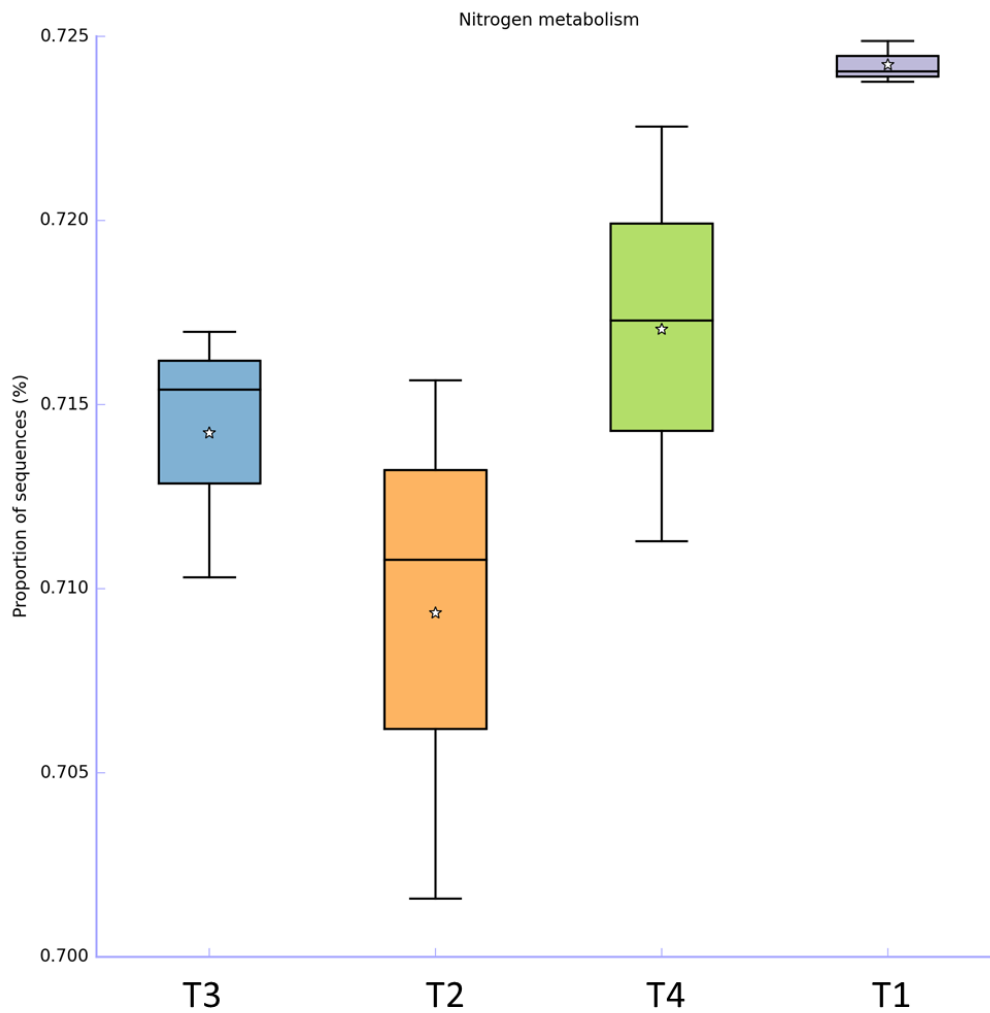


Figura 22 Predicción del metabolismo del nitrógeno. Etapa inicial

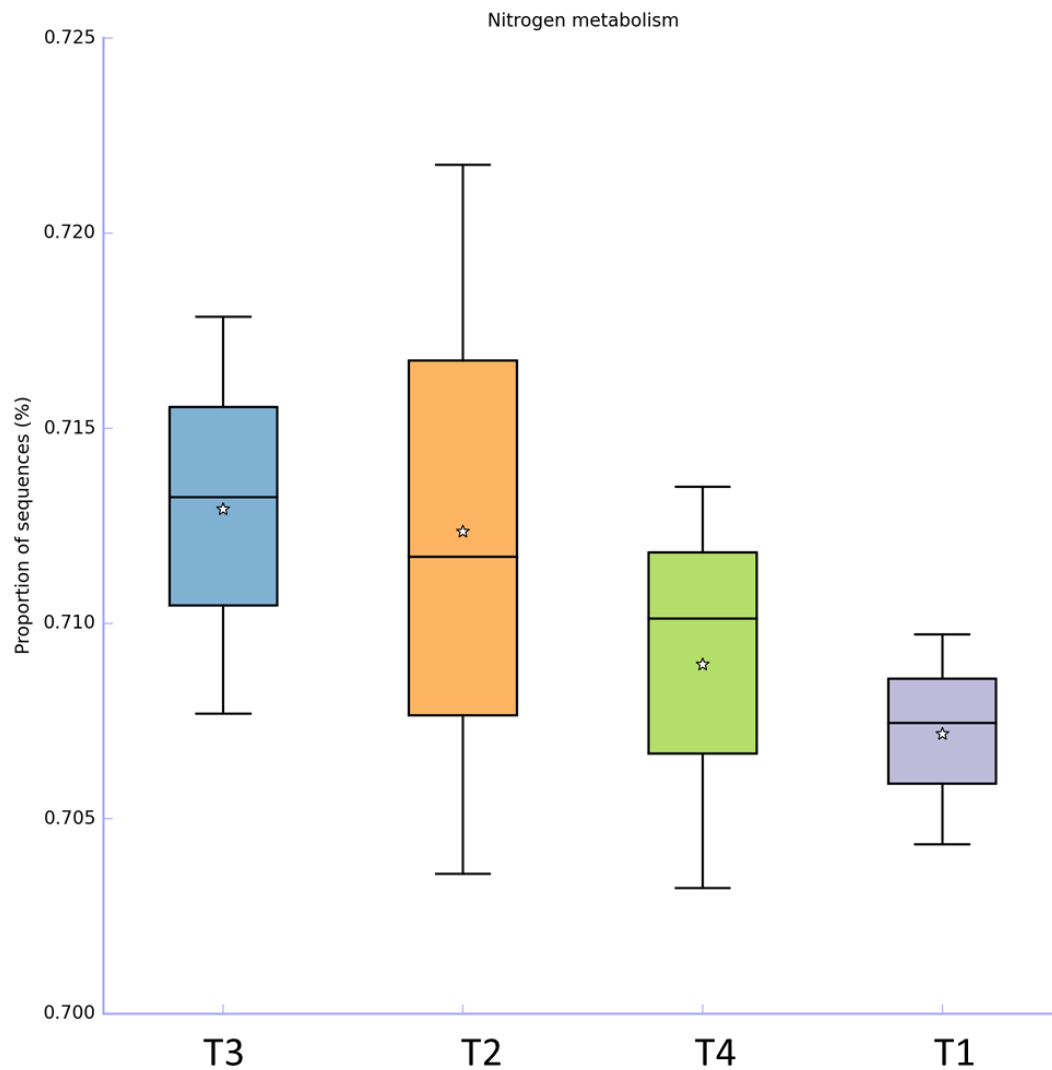


Figura 23 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa incorporación

*Método estadístico: Kruskal-Wallis con corrección de tests múltiples de Benjamini Hochberg $p < 0,05$.

Sin embargo, en ninguna de las etapas se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos en términos de metabolismo del nitrógeno (Fig 22-25). Evaluando los diferentes grupos ortólogos (KO) relacionados a funciones

metabólicas específicas de transformación de nitrógeno tampoco se encontraron diferencias (Anexo H).

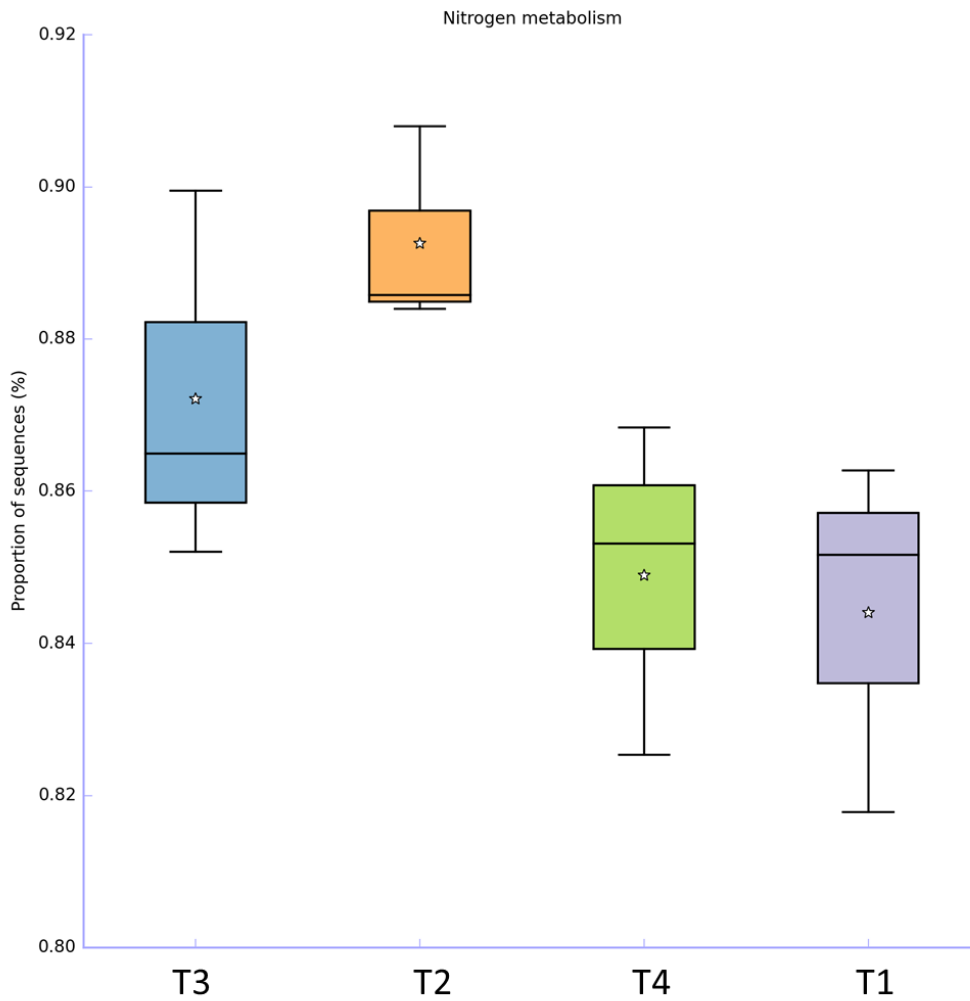


Figura 24 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa floración

*Método estadístico: Kruskal-Wallis con corrección de tests múltiples de Benjamini Hochberg $p < 0,05$.

La precisión de los resultados de esta herramienta fue estimada a través del índice NSTI, obteniendo resultados bajos para todas las etapas (Resultados altos indican menor precisión al representar una mayor distancia filogenética entre el taxón evaluado y el taxón de referencia) (Anexo I).

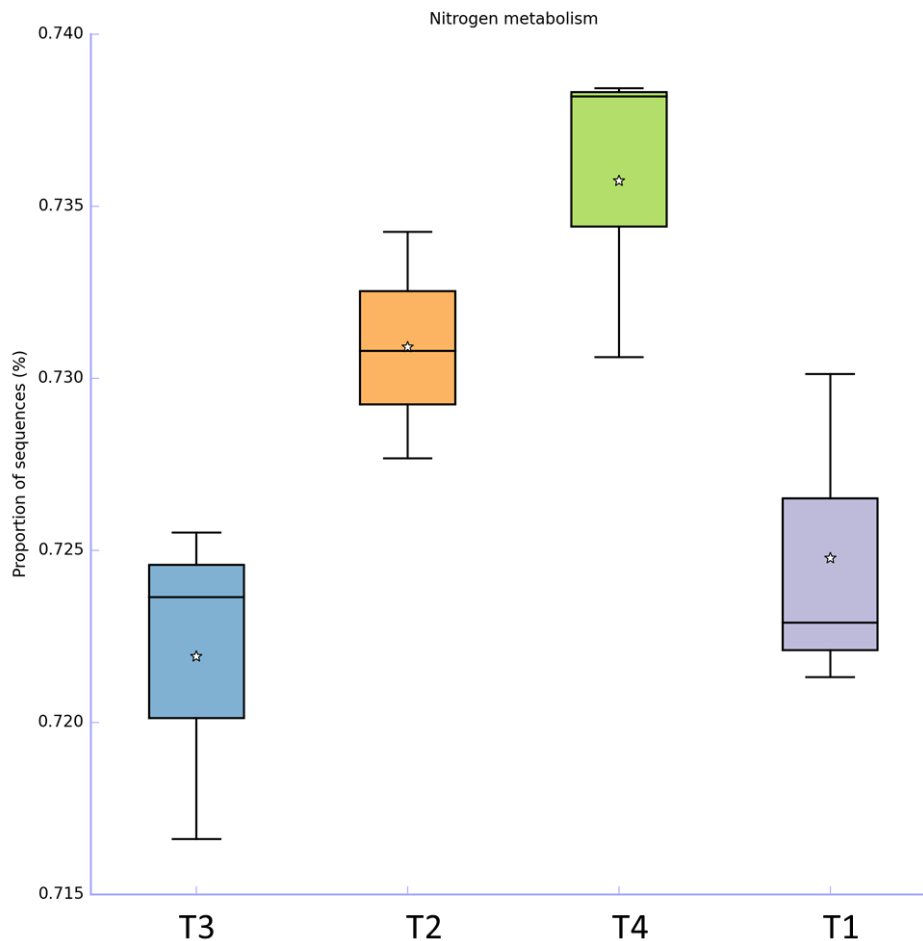


Figura 25 Predicción metabolismo del nitrógeno. Etapa final

*Método estadístico: Kruskal-Wallis con corrección de tests múltiples de Benjamini Hochberg $p < 0,05$.

Efectos de los diferentes tratamientos de tamo sobre la actividad de la comunidad bacteriana asociada al ciclo del nitrógeno

Tres enzimas asociadas con el ciclo del nitrógeno, relacionadas directamente con la disponibilidad de este nutriente en el suelo fueron determinadas con el fin de evaluar la influencia que tienen diferentes manejos del tamo de arroz sobre la actividad metabólica microbiana vinculada a los procesos de fijación, amonificación y mineralización.

Para determinar la fijación de nitrógeno se evaluó el potencial de la enzima nitrogenasa a través del ensayo de reducción de acetileno. Los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en ninguna de las etapas muestreadas de acuerdo al test de Kruskal- Wallis (etapa inicial $p= 0,56$; etapa de incorporación $p= 0,90$; etapa de floración $p= 0,37$; etapa final $p= 0,59$) (Fig. 30), infiriendo que los tratamientos de manejo del tamo de arroz no tienen gran influencia sobre el proceso de fijación de nitrógeno. A pesar de lo anterior, evaluando la actividad de la enzima a través de las diferentes etapas de muestreo, se observa un patrón común para todos los tratamientos con un decrecimiento en las etapas de incorporación y floración y un leve aumento hacia la etapa final del cultivo, a excepción del tratamiento de cobertura inoculado con microorganismos, el cual decrece progresivamente a través del tiempo, alcanzando la actividad más baja de potencial de fijación en la etapa final de muestreo. Este comportamiento de la enzima puede deberse a el alto costo energético que durante la etapa de incorporación no puede suplirse debido a que el proceso de degradación del material vegetal no ha sido suficiente para disponer de fuentes lábiles de carbono aprovechables como insumo energético. Este efecto ha sido descrito por Vanegas en suelos de cultivo de arroz colombianos (Uribe Velez, 2012). Otro factor que puede influir sobre la actividad de la enzima nitrogenasa para esta etapa es que el suelo fue arado, lo que genera una mayor aireación, inhibiendo así la actividad de la enzima.

Los bajos niveles de potencial de fijación de nitrógeno durante la etapa de floración responden a la regulación de la actividad de la enzima a nivel transcripcional dada por las altas concentraciones del amonio (Halbleib & Ludden, 2000). Al llegar a esta etapa se habían aplicado todos los esquemas de fertilización, que incluían fertilizantes a base de urea, los cuales que pueden suplir la demanda de nitrógeno para los microorganismos, así con nitrógeno disponible, las bacterias fijadoras inhiben la actividad de la enzima (Gordon & Brill, 1974). Esta inhibición ha sido comprobada previamente tanto en bacterias de vida libre como en las asociadas simbióticamente con plantas (Laane, Krone, Konings, Haaker, & Veeger, 1980). Así mismo, Rao y colaboradores reportaron en experimentos de laboratorio que la fijación de nitrógeno fue suprimida casi en un 60% cuando se aplicaban entre 100 y 150 kg/ha⁻¹ de N y era inhibida completamente cuando se aplicaban más de 300 kg/ha⁻¹ de N (Rao, 1976), corroborando que los bajos valores del potencial de la enzima nitrogenasa durante la etapa de floración son consecuencia de la aplicación del N inorgánico del fertilizante a base de urea (229,1 kg/ha⁻¹ de N para este experimento).

A pesar de no haber diferencias estadísticas entre los tratamientos durante la etapa de floración, se observa que la actividad de la enzima es similar entre los tratamientos de cobertura con y sin inocular (COB+MO y COB) y entre los tratamientos de incorporación inoculado y quema (INC+MO y QUEMA), siendo consistente con lo hallado en los agrupamientos del mapa de calor para esta misma etapa, haciendo posible una respuesta metabólica diferente en los microorganismos fijadores de nitrógeno en función del manejo del tamo, que a largo plazo puede ser más evidente.

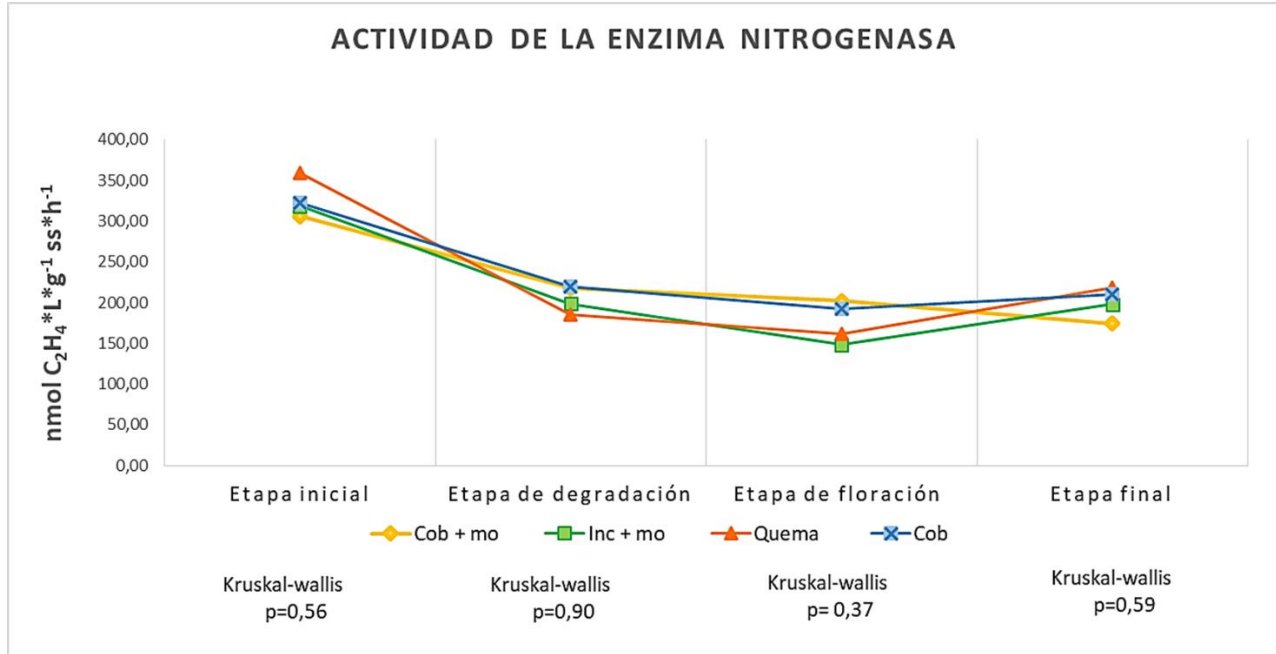


Figura 26 Actividad de la enzima nitrogenasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo

*Método estadístico: test de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni; valor de significancia $p < 0,1$

Para la etapa final, cuando el nitrógeno inorgánico proveniente de la fertilización ha sido usado por las plantas y demás organismos edáficos y/o se ha perdido del sistema suelo por procesos de lixiviación y/o volatilización del amonio (Piotrowska-Długosz & Wilczewski, 2014), se activa nuevamente la enzima para alcanzar los niveles de nitrógeno necesarios, lo cual podría explicar los resultados de la etapa final del cultivo donde la actividad de la enzima tiende a incrementar.

Para la enzima proteasa se encuentran diferencias estadísticas entre los tratamientos planteados en la etapa de degradación, de acuerdo al test de Kruskal-wallis con corrección

de Bonferroni ($p > 0,1$) (Fig. 31), en donde se diferencian los tratamientos que fueron incorporados con el consorcio microbiano (COB+MO y INC+MO) del tratamiento de cobertura sin inocular (COB). Lo anterior puede ser explicado por la presencia de la bacteria *Bacillus pumilus* en el inóculo, seleccionada por su capacidad proteolítica para la creación del consorcio y caracterizada en otros estudios como una de las mayores productoras de proteasas en suelos de cultivo de arroz (Watanabe & Hayano, 1993). Esto también confirma que la actividad de la cepa bacteriana ejerce su función bajo condiciones de campo, evidenciando la importancia del uso de este tipo de alternativas para degradar materiales recalcitrantes.

Adicionalmente, al igual que la enzima nitrogenasa se evidencia que la actividad de la enzima proteasa tiene una dinámica a través del tiempo en respuesta a la etapa de muestreo. En la etapa inicial se observan valores muy cercanos entre tratamientos, reflejando una homogeneidad en la actividad de la enzima en el terreno antes de implementar los diferentes manejos del tamo de arroz a pesar de que los análisis taxonómicos mostraban que el terreno del tratamiento 1 era diferente de los demás; durante la etapa de floración, se encuentran los valores más altos de la enzima proteasa para todos los tratamientos, suponiendo una mayor actividad hidrolítica que puede responder a una mayor disponibilidad de sustrato para la enzima, por una mayor disponibilidad de nutrientes provenientes de la descomposición del tamo de arroz. El anterior planteamiento es apoyado en los resultados de la enzima para los tratamientos alternos a la quema (COB+MO, INC+MO y COB), cuyos valores de actividad proteolítica fueron más altos, indicando una mayor disponibilidad de N orgánico proveniente de la materia orgánica (Uribe Velez, 2012). Adicionalmente el aumento de la humedad en el suelo puede potenciar la actividad proteolítica durante esta etapa del cultivo (Piotrowska-Długosz & Wilczewski, 2014).

Durante la última etapa muestreada, los valores de la enzima disminuyen en todos los tratamientos, dado probablemente por una disminución en el contenido de fuentes nitrogenadas posterior a la etapa de mayor actividad.

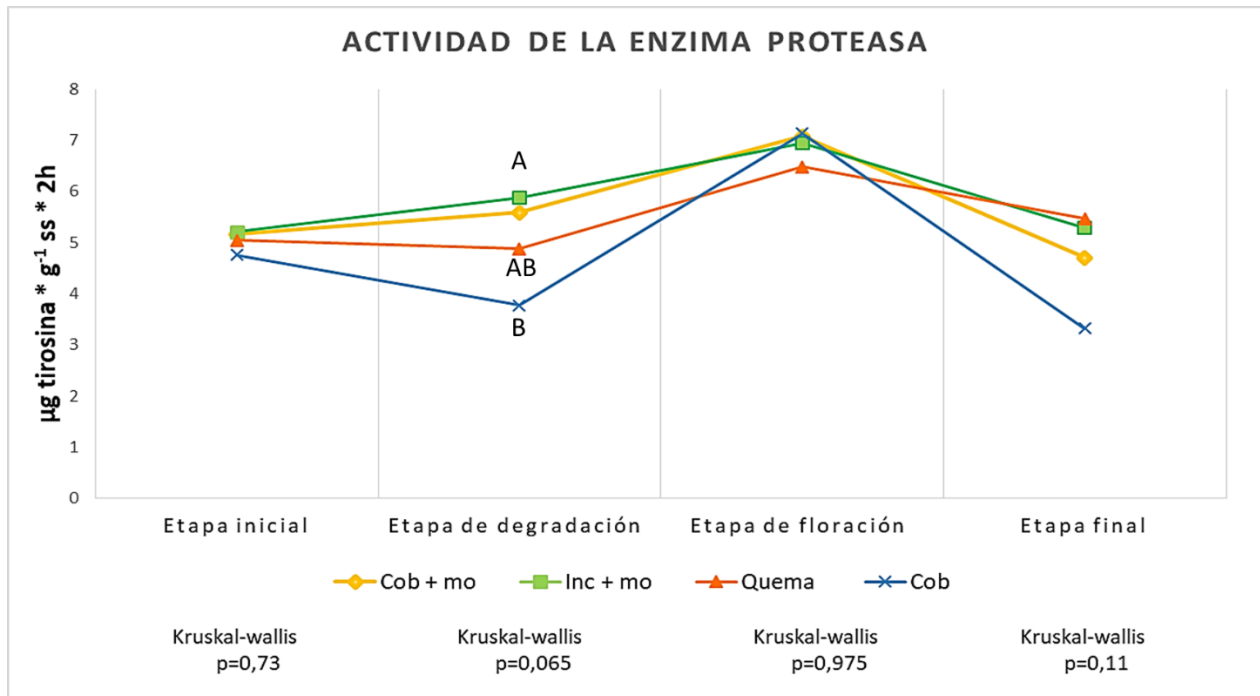


Figura 27 Actividad de la enzima proteasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo

*Método estadístico: test de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni; valor de significancia $p < 0,1$

Por su parte, la actividad de la enzima ureasa mostró un patrón parecido a la actividad proteolítica (Fig. 32), para la etapa inicial se presentaron valores de actividad muy cercanos entre las parcelas de los diferentes tratamientos sin diferencias estadísticas entre ellos ($p = 0,58$); para la etapa de incorporación se encontraron diferencias estadísticas de acuerdo al test de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$), distinguiéndose el tratamiento de cobertura inoculado con el consorcio de degradación del tratamiento de cobertura sin inocular, lo cual evidencia el efecto sinérgico de la cobertura del terreno con el tamo de arroz junto con la actividad ejercida por el consorcio de degradación sobre el material, que como consecuencia

de una mayor tasa de descomposición, permite una mayor disponibilidad de fuentes orgánicas de amonio.

La actividad de la enzima ureasa discrepó entre tratamientos durante la etapa de floración, diferenciándose los tratamientos de incorporación con microorganismos (INC+MO) y quema (QUEMA) (valores más altos) de los tratamientos de cobertura con y sin inocular (COB+MO y COB) ($p= 0,06$). Llama la atención que el patrón inverso fue encontrado en los resultados de la enzima nitrogenasa, donde los tratamientos de cobertura (COB+MO y COB) se encontraban más altos que los tratamientos incorporados (INC+MO y QUEMA), confirmando que la disponibilidad de nutrientes y/o los sustratos sobre los que actúan son diferentes, siendo consistente con lo hallado en los mapas de calor para esta etapa. Es decir que los diferentes manejos de tamo de arroz generan cambios en la actividad metabólica asociada a la transformación del nitrógeno a corto plazo, pudiendo modular también la composición y estructura de la comunidad microbiana. Hacia la etapa final, los valores de la enzima tienden a disminuir siendo más cercanos entre tratamientos, sin presentar diferencias significativas ($p= 0,38$), siendo también consistente con la homogeneidad encontrada en las abundancias de los diferentes taxones así como en los resultados del índice de diversidad beta.

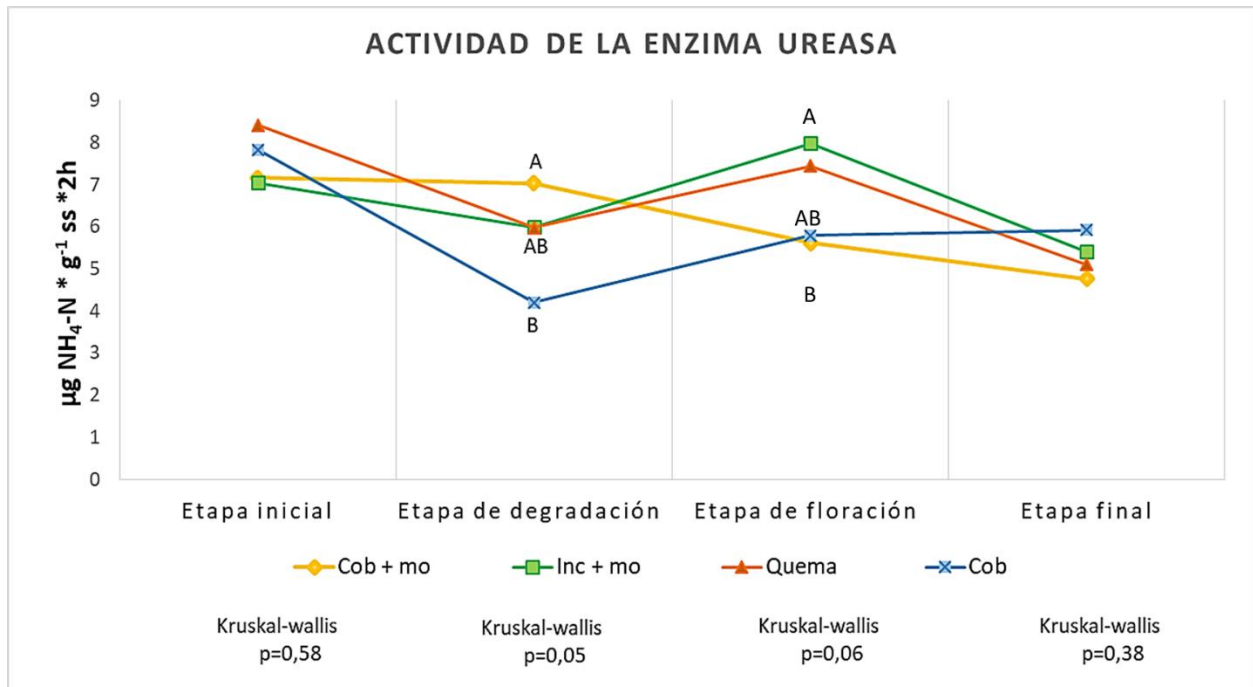


Figura 28 Actividad de la enzima ureasa para los tratamientos en cada una de las etapas de muestreo.

*Método estadístico: test de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni; valor de significancia $p < 0,1$

Se observa que la actividad de la enzima ureasa para los tratamientos INC+MO, QUEMA y COB fue mayor durante la etapa de floración, y disminuyó para los tratamientos COB+MO, INC+MO y QUEMA hacia el final del cultivo, considerando adicionalmente que la etapa de crecimiento del cultivo puede influenciar la actividad de la enzima. Este fenómeno ha sido observado tanto por Zeng et.al. (2005) como por Hussain et.al. (2012) en suelos de cultivo de arroz en condiciones de campo, quienes vincularon la baja actividad enzimática en los estados finales de desarrollo del cultivo con una menor tasa de rizodeposición, dado que las plantas liberan menos componentes orgánicos al suelo cuando alcanzan su madurez, como

resultado el metabolismo microbiano se ve afectado y disminuye (Zeng et al., 2005) (Hussain et al., 2012)

De acuerdo a lo anterior, podemos concluir que el metabolismo de los microorganismos así como la composición y estructura de las comunidades edáficas son influenciados por las plantas de acuerdo a sus requerimientos nutricionales -en función de su estado fenológico- a través de la liberación de exudados radiculares, que potencian la respuesta y colonización de géneros específicos de microorganismos (Fierer, 2017) (Schloter et al., 2018). Previamente se ha demostrado que el incremento en la exudación de la raíz de plantas de arroz, alcanza un máximo en estado reproductivo (floración) y decrece hacia la etapa final donde la planta alcanza la madurez (Watanabe, et al., 2004) (Pittol et al., 2018), por lo anterior el patrón común encontrado en las actividades enzimáticas corresponde a un efecto del aumento y posterior disminución de los exudados radiculares que pueden ejercer influencia sobre el suelo de soporte muestreado, debido a la extensa y compleja red radicular particular del cultivo. Lo anterior concuerda con el incremento de los conteos de microorganismos y ASVs encontrados en el suelo rizosférico en comparación con los encontrados en muestras de suelo de soporte.

También se evidencia que el metabolismo microbiano es afectado por los diferentes manejos del tamo de arroz en respuesta a la disponibilidad de sustratos provenientes de la descomposición del tamo de arroz. Las enzimas decrecen a medida que disminuye la disponibilidad del sustrato sobre el cual actúan, pudiendo ser otro factor influyente sobre el comportamiento decreciente de la proteasa y la ureasa hacia el punto final de muestreo.

4. Conclusiones y recomendaciones

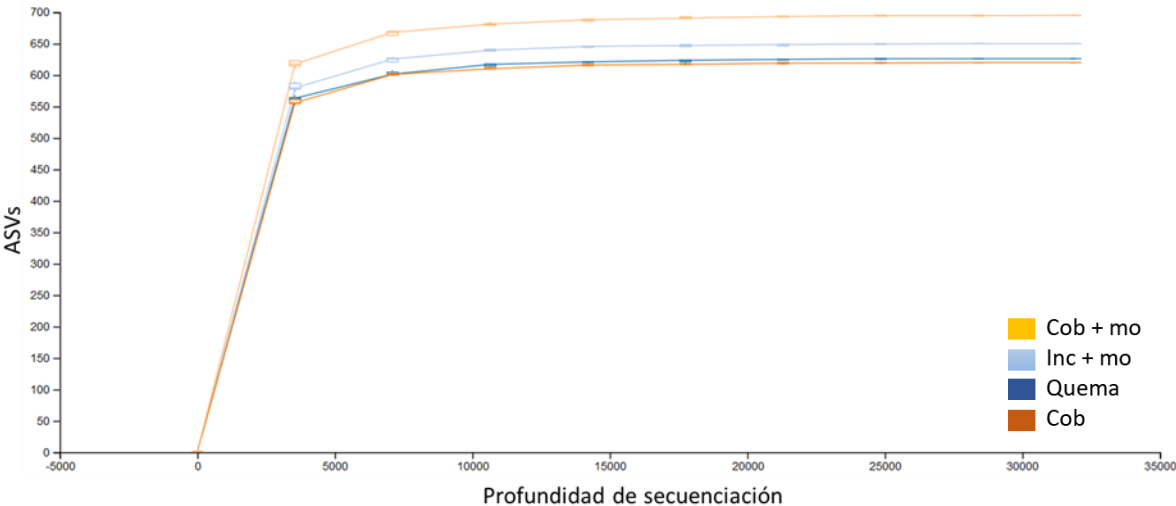
4.1 Conclusiones

1. La diversidad alfa y beta de la comunidad bacteriana no fue afectada por los tratamientos de manejo del tamo planteados. Sin embargo, se determinó que la aplicación del consorcio microbiano si tiene un efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana durante la fase de la degradación del tamo de arroz.
2. El manejo del tamo tiene un efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo rizosférico al momento de la floración.
3. El manejo del tamo de arroz en cobertura induce un efecto de reclutamiento de una comunidad microbiana diferente en el microbioma rizosferico de la planta.
4. La aplicación de tamo de arroz inoculado con el consorcio microbiano incrementa la actividad proteolítica en etapas tempranas de descomposición. En cuanto a la actividad ureolítica, esta es mayor cuando se cubre el terreno con tamo de arroz inoculado, sugiriendo un proceso de mineralización más eficiente.
5. Los mapas de calor construidos con base en las abundancias de los taxones compartidos, permitieron identificar un efecto trascendental sobre la estructura de la comunidad microbiana dado por el retorno de tamo de arroz al suelo en etapas finales del ciclo de cultivo distinguiéndose completamente de la comunidad microbiana del tratamiento de quema.

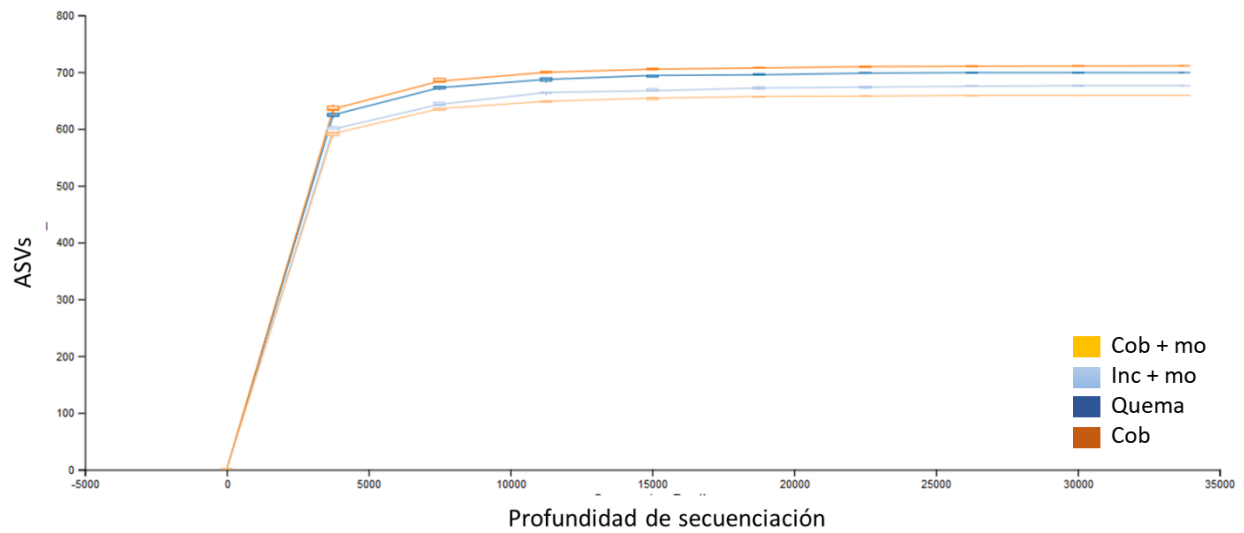
4.2 Recomendaciones

- Se recomienda considerar la incorporación o la cobertura del terreno con tamo de arroz inoculado como opciones sustentables de manejo en campo que contribuyen benéficamente al mantenimiento de la fertilidad del suelo por el retorno de nutrientes a través de procesos de mineralización.
- Con los hallazgos encontrados, se recomienda evaluar la aplicación de estos tratamientos en más de un ciclo de cultivo.
- Evaluar otras herramientas de predicción funcional que sean más aplicables a secuencias provenientes de suelo.
- Realizar determinaciones de atributos del suelo como carbono lábil, materia orgánica disuelta, fósforo disponible (entre otros) que pueden estar variando en función de diferentes manejos del tamo de arroz.

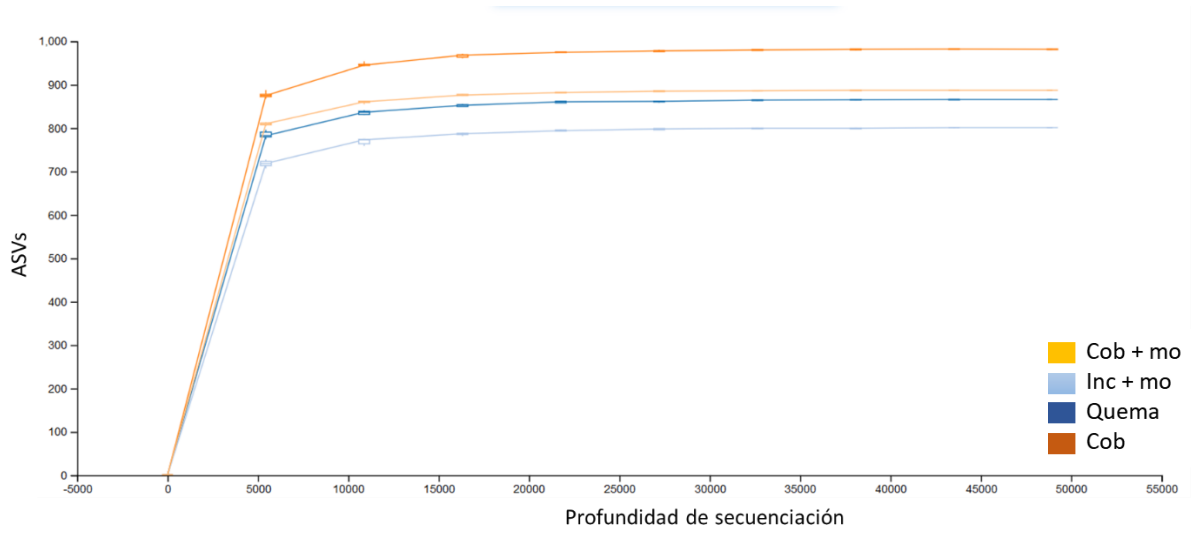
A. Anexo: Gráficas de rarefacción de las etapas de muestreo



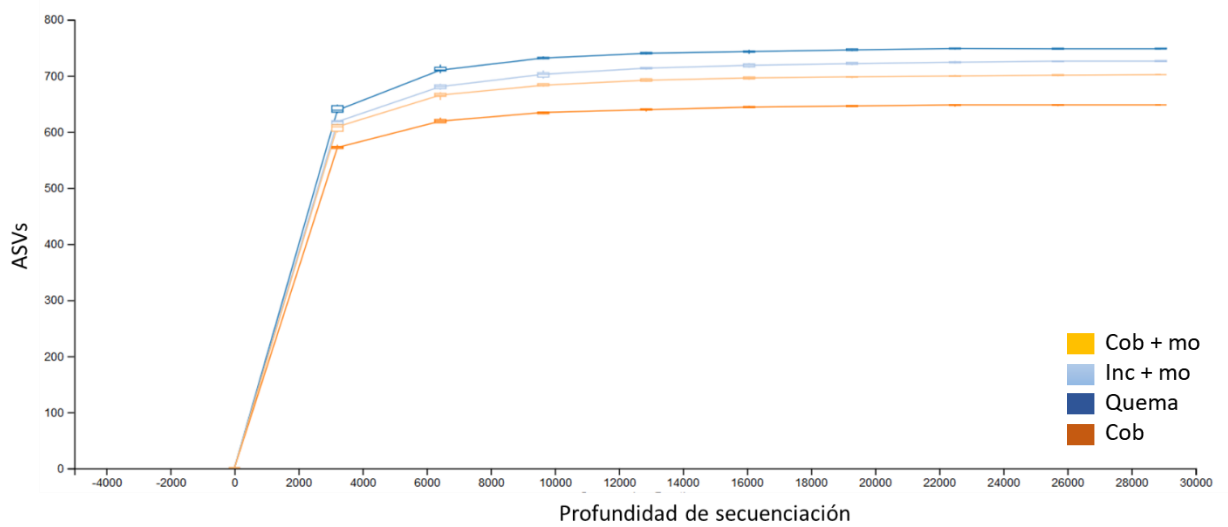
Gráfica suplementaria. Gráfica de rarefacción etapa inicial. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.



Gráfica suplementaria. Gráfica de rarefacción etapa incorporación. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.



Gráfica suplementaria. Gráfica de rarefacción etapa de floración. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.



Gráfica suplementaria. Gráfica de rarefacción etapa final. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo.

B. ANEXO: Tablas de resultados índices de diversidad

ETAPA INICIAL				
RIQUEZA ESPECÍFICA				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	0.428	0,512	0,512
	COB	0.428	0,512	0,512
	COB+MO	3.857	0,049	0,099
INC+MO	COB	0.428	0,512	0,512
	COB+MO	3857	0,049	0,099
COB	COB+MO	3.857	0,049	0,099

ETAPA DE INCORPORACIÓN				
RIQUEZA ESPECÍFICA				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	2.333	0,126	0,379
	COB	0.047	0,827	0,827
	COB+MO	3.857	0,049	0,297
INC+MO	COB	1190	0,275	0,412
	COB+MO	0.428	0,512	0,615
COB	COB+MO	1.190	0,275	0,412

ETAPA DE FLORACIÓN				
RIQUEZA ESPECÍFICA				
QUEMA	INC+MO	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
	COB	3.857	0,049	0,099
	COB+MO	2333	0,126	0,189
INC+MO	COB	3.857	0,049	0,099
	COB+MO	0.428	0,512	0,512
COB	COB+MO	3857	0,049	0,099

ETAPA FINAL				
RIQUEZA ESPECÍFICA				
QUEMA	INC+MO	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
	COB	2.333	0,126	0,368
	COB+MO	0.047	0,827	0,827
INC+MO	COB	2.333	0,126	0,368
	COB+MO	0.047	0,827	0,827
COB	COB+MO	1764	0,184	0,368

Resultados de comparación de diversidad alfa entre tratamientos en cada una de las etapas de muestreo utilizando la riqueza específica basada en los ASVs encontrados.

ETAPA INICIAL				
ÍNDICE DE SHANNON				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	1.190	0,275	0,4128
	COB	0.047	0,827	0,827
	COB+MO	3.857	0,0495	0,099
INC+MO	COB	0.428	0,512	0,615
	COB+MO	3.857	0,049	0,099
COB	COB+MO	3.857	0,049	0,099

ETAPA DE INCORPORACIÓN				
ÍNDICE DE SHANNON				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	3.857	0,049	0,148
	COB	0.047	0,827	0,827
	COB+MO	3.857	0,049	0,148
INC+MO	COB	0.428	0,512	0,769
	COB+MO	0.047	0,827	0,827
COB	COB+MO	0.428	0,512	0,769

ETAPA DE FLORACIÓN				
ÍNDICE DE SHANNON				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	0.428	0,512	0,512
	COB	3.857	0,049	0,074
	COB+MO	3857	0,049	0,074
INC+MO	COB	3857	0,049	0,074
	COB+MO	3.857	0,049	0,074
COB	COB+MO	1190	0,275	0,33

ETAPA FINAL				
ÍNDICE DE SHANNON				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	0.428	0,512	0,615
	COB	2.333	0,126	0,253
	COB+MO	0.047	0,827	0,827
INC+MO	COB	2333	0,126	0,253
	COB+MO	0.428	0,512	0,615
COB	COB+MO	2333	0,126	0,253

Resultados de comparación de diversidad alfa entre tratamientos en cada una de las etapas de muestreo utilizando el índice de Shannon.

ETAPA INICIAL				
ÍNDICE DE EQUITABILIDAD (PIELOU)				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	0.047	0,827	0,827
	COB	0.428	0,512	0,615
	COB+MO	1.190	0,275	0,412
INC+MO	COB	1.190	0,275	0,412
	COB+MO	3.857	0,049	0,297
COB	COB+MO	2.333	0,126	0,379

ETAPA DE INCORPORACIÓN				
ÍNDICE DE EQUITABILIDAD (PIELOU)				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	3.857	0,049	0,148
	COB	3.857	0,049	0,148
	COB+MO	0.428	0,512	0,512
INC+MO	COB	1.190	0,275	0,412
	COB+MO	1.190	0,275	0,412
COB	COB+MO	0.428	0,512	0,512

ETAPA DE FLORACIÓN				
ÍNDICE DE EQUITABILIDAD (PIELOU)				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	0.428	0,512	0,615
	COB	2.333	0,126	0,253
	COB+MO	1.190	0,275	0,412
INC+MO	COB	3.857	0,049	0,148
	COB+MO	3.857	0,049	0,148
COB	COB+MO	0.047	0,827	0,827

ETAPA FINAL				
ÍNDICE DE EQUITABILIDAD (PIELOU)				
Grupo 1	Grupo 2	H	Valor de <i>p</i>	Valor <i>q</i>
QUEMA	INC+MO	0.047	0,827	0,827
	COB	3.857	0,049	0,297
	COB+MO	0.428	0,512	0,769
INC+MO	COB	0.428	0,512	0,769
	COB+MO	0.047	0,827	0,827
COB	COB+MO	0.428	0,512	0,769

Resultados de comparación de diversidad alfa entre tratamientos en cada una de las etapas de muestreo utilizando el índice de Equitabilidad de Pielou.

C. ANEXO: Tablas de resultados diversidad beta-Bray Curtis

ETAPA INICIAL					
DISTANCIA DE BRAY-CURTIS					
Grupo 1	Grupo 2	Permutaciones	Pseudo-F	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	999	0.894	0,599	0,599
	COB	999	1.120	0,313	0,375
	COB+MO	999	1.728	0,104	0,156
INC+MO	COB	999	1.229	0,091	0,156
	COB+MO	999	1.818	0,103	0,156
COB	COB+MO	999	1.757	0,096	0,156

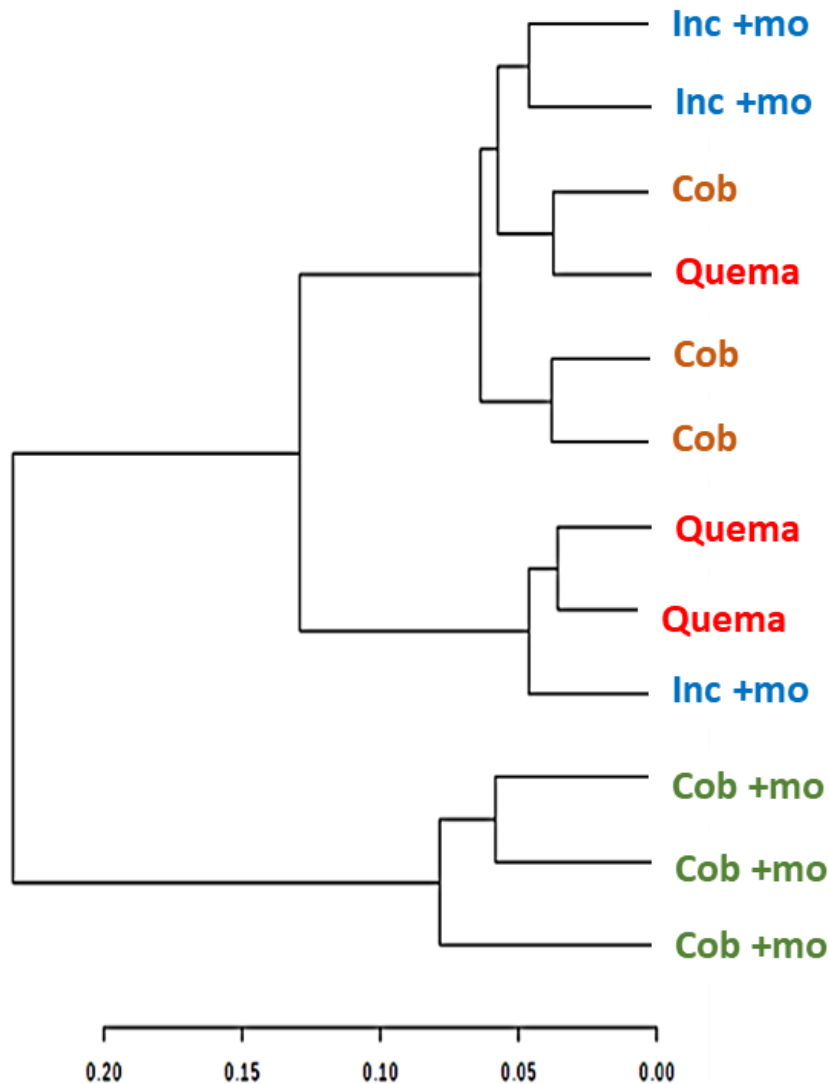
ETAPA DE INCORPORACIÓN					
DISTANCIA DE BRAY-CURTIS					
Grupo 1	Grupo 2	Permutaciones	Pseudo-F	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	999	1.098	0,294	0,394
	COB	999	1.088	0,29	0,394
	COB+MO	999	1.32	0,117	0,394
INC+MO	COB	999	1.037	0,394	0,394
	COB+MO	999	1.009	0,394	0,394
COB	COB+MO	999	1.049	0,297	0,394

ETAPA DE FLORACIÓN					
DISTANCIA DE BRAY-CURTIS					
Grupo 1	Grupo 2	Permutaciones	Pseudo-F	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	999	1.016	0,303	0,487
	COB	999	1.145	0,325	0,487
	COB+MO	999	1.015	0,5	0,6
INC+MO	COB	999	1.425	0,104	0,487
	COB+MO	999	1.225	0,194	0,487
COB	COB+MO	999	0.869	0,882	0,882

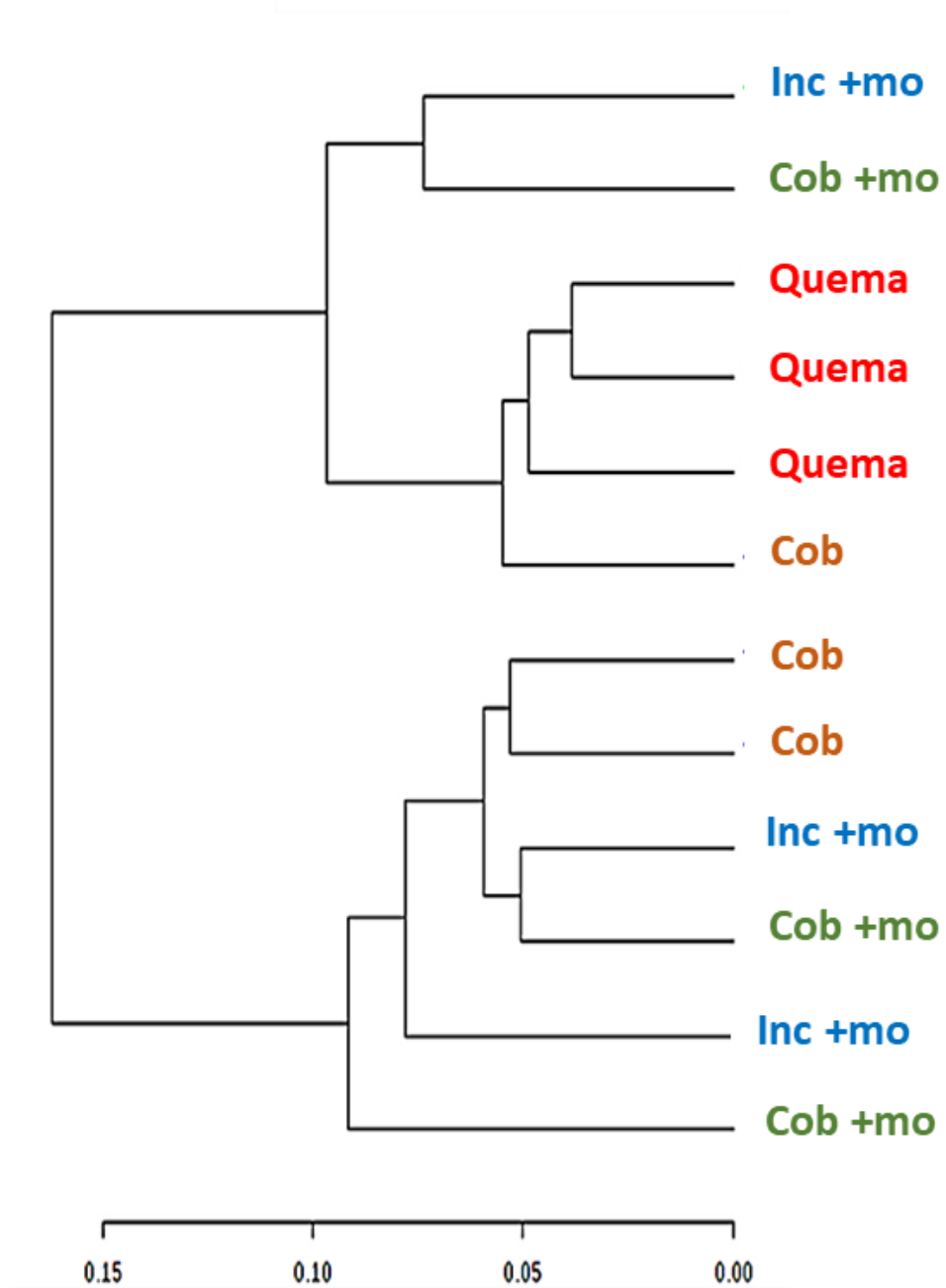
ETAPA FINAL					
DISTANCIA DE BRAY-CURTIS					
Grupo 1	Grupo 2	Permutaciones	Pseudo-F	Valor de p	Valor q
QUEMA	INC+MO	999	0.950	0,676	0,734
	COB	999	0.102	0,096	0,576
	COB+MO	999	0.940	0,5	0,734
INC+MO	COB	999	1.093	0,319	0,734
	COB+MO	999	0.974	0,734	0,734
COB	COB+MO	999	1.039	0,525	0,734

Resultados de comparación de diversidad beta entre tratamientos en cada una de las etapas de muestreo utilizando la distancia de Bray Curtis.

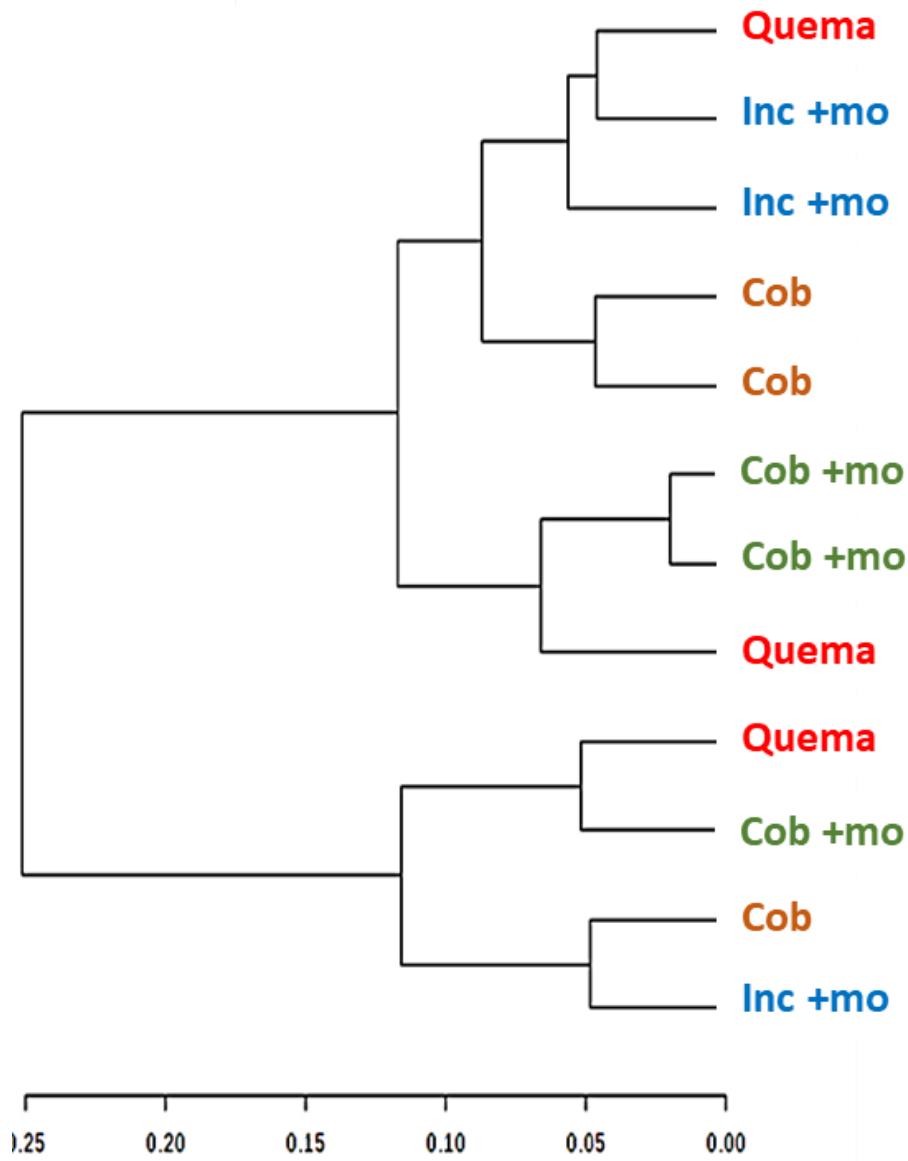
D. ANEXO: Dendogramas



Dendograma a nivel de Filum de la Etapa Inicial. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo. Las letras P1-P4 representan cada una de las parcelas del tratamiento muestreadas

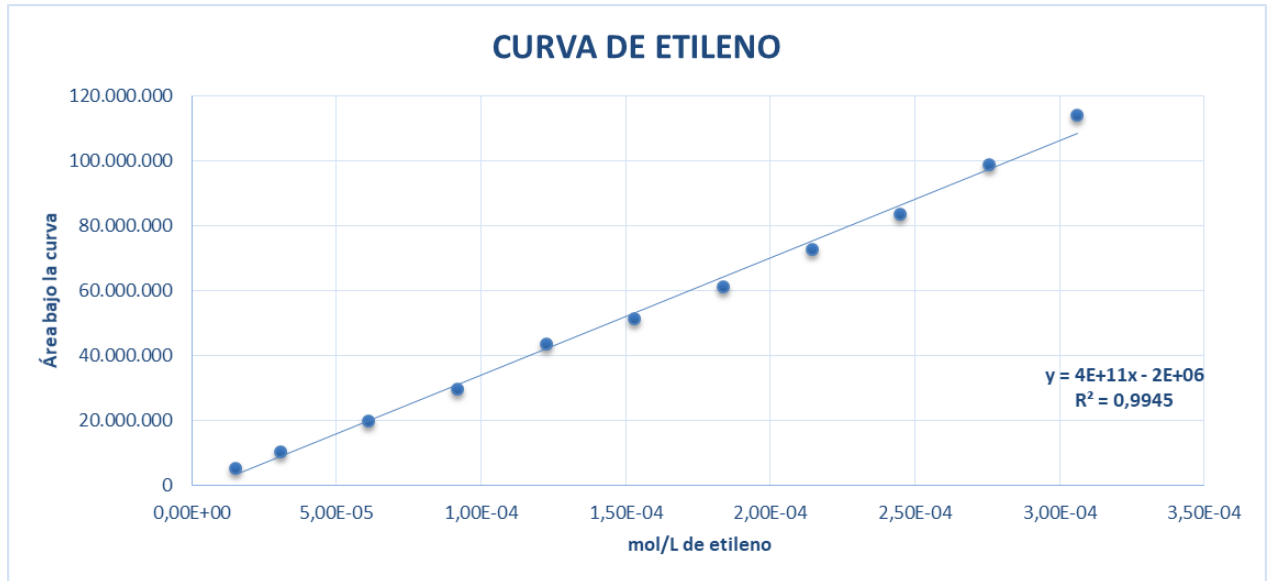


Dendrograma a nivel de Filum de la Etapa de incorporación. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo. Las letras P1-P4 representan cada una de las parcelas del tratamiento muestreada.



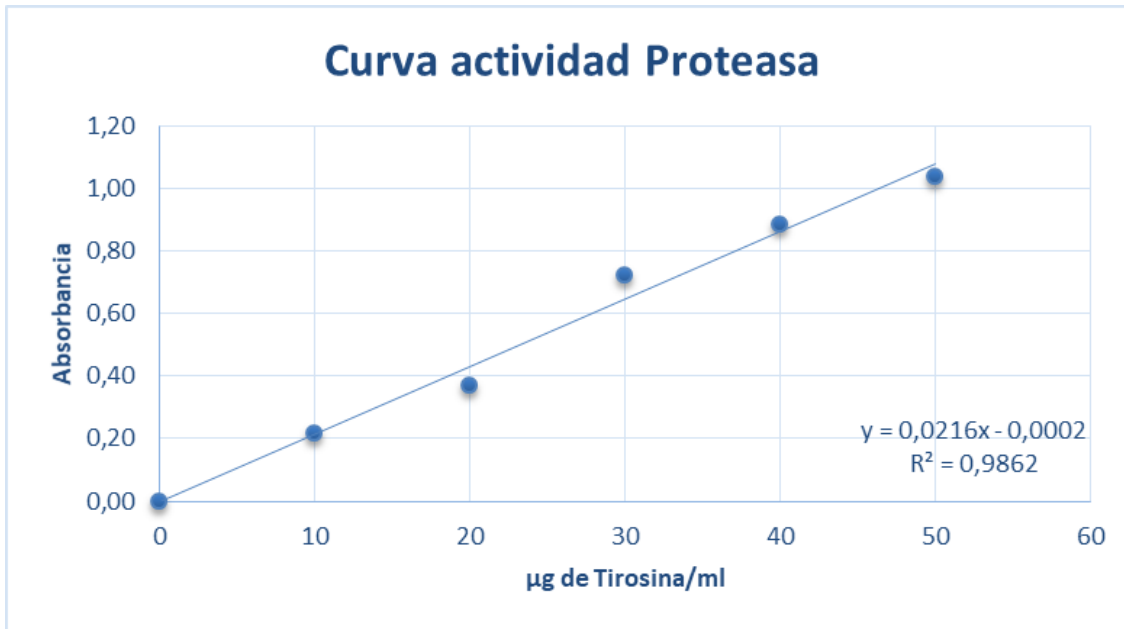
Dendrograma a nivel de Filum de la Etapa final. COB+MO: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo inoculado. INC+MO: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado. QUEMA: Tratamiento de quema del tamo. COB: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo. Las letras P1-P4 representan cada una de las parcelas del tratamiento muestreadas.

E. Curva de calibración concentración de etileno



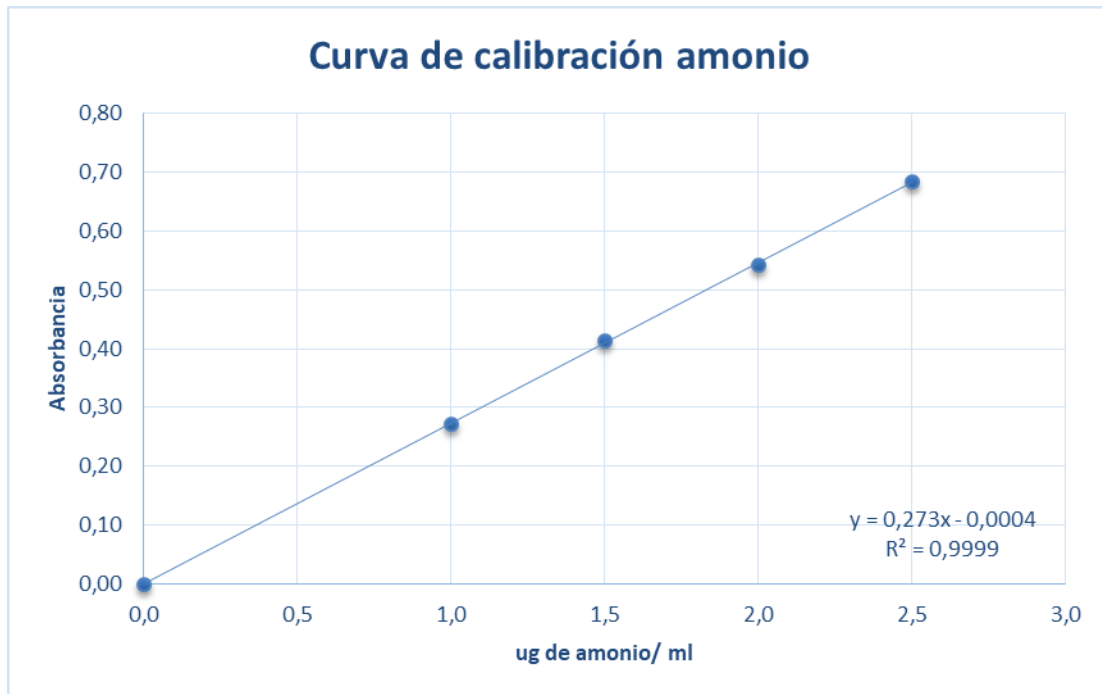
Regresión lineal de la concentración de moles de etileno/litro correspondiente al área bajo la curva para determinar el potencial de fijación biológica de nitrógeno.

F. Curva de calibración enzima proteasa



Curva de calibración de Tirosina para determinar la actividad de la enzima proteasa

G. Curva de calibración enzima ureasa



Curva de calibración de amonio para determinar la actividad de la enzima ureasa.

H. Grupos ortólogos de genes analizados con PICRUST

11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to ammonia	K00363
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Hydroxylamine reduction		K05601
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Hydroxylamine reduction		K15864
11_Nitrogen cycle Nitrogen Fixation			K02588
11_Nitrogen cycle Nitrogen Fixation			K02591
11_Nitrogen cycle Nitrogen Fixation			K02586
11_Nitrogen cycle Nitrogen Fixation			K00531
11_Nitrogen cycle Nitrogen Fixation			K02595
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00260
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00261
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00262
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K01915
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K15371
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00265
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00266
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00264
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K05597
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K01425
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K05597
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K01953
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00284
11_Nitrogen cycle Ammonia assimilation			K00264
11_Nitrogen cycle Nitrification (aerobic ammonia oxydation, bacterial and archea Ammonia to hydroxylamine			K10944
11_Nitrogen cycle Nitrification (aerobic ammonia oxydation, bacterial and archea Ammonia to hydroxylamine			K10945
11_Nitrogen cycle Nitrification (aerobic ammonia oxydation, bacterial and archea Ammonia to hydroxylamine			K10946
11_Nitrogen cycle Nitrification (aerobic ammonia oxydation, bacterial and archea Hydroxylamine to nitrite			K10535
11_Nitrogen cycle Nitrification	Nitrite to nitrate		K15905
11_Nitrogen cycle Nitrification	Nitrite to nitrate		K15906
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00370
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00371
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00372
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to nitrite	K10534
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to nitrite	K00360
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to nitrite	K15875
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K08345
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00373
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00374
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K08345
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K08346
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K08347
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K08361
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K00372
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K02567
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K02568
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K15878
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrate to nitrite	K15879
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrite to nitrite oxide	K00368
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrite to nitrite oxide	K15864
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrite oxide to nitrous oxide	K04561
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrite oxide to nitrous oxide	K02305
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Denitrification	Nitrous oxide to nitrogen	K00376
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Dissimilatory nitrate reductor	Nitrate to ammonia	K03385
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Dissimilatory nitrate reductor	Nitrate to ammonia	K04013
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Dissimilatory nitrate reductor	Nitrate to ammonia	K04014
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Dissimilatory nitrate reductor	Nitrate to ammonia	K04015
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to ammonia	K00362
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to ammonia	K00366
11_Nitrogen cycle Nitrogenated compounds Reduction	Assimilatory nitrate reduction	Nitrate to ammonia	K00363

Grupos ortólogos de genes vinculados con sub procesos del ciclo del nitrógeno.

I. Resultados precisión de las predicciones de la herramienta PICRUST

NSTI ETAPA INICIAL		
#Sample	Metric	Value
T1P1_T0	Weighted NSTI	0.18686058396897887
T1P2_T0	Weighted NSTI	0.1934618533359158
T1P3_T0	Weighted NSTI	0.19431629982844326
T2P1_T0	Weighted NSTI	0.18742020816981028
T2P2_T0	Weighted NSTI	0.19233589033372597
T2P4_T0	Weighted NSTI	0.19193496248021547
T3P1_T0	Weighted NSTI	0.19328855574372417
T3P3_T0	Weighted NSTI	0.18737940424381716
T3P4_T0	Weighted NSTI	0.19167833297256429
T4P1_T0	Weighted NSTI	0.1926716724282457
T4P2_T0	Weighted NSTI	0.1852957907401333
T4P4_T0	Weighted NSTI	0.18512864006174384

NSTI ETAPA INCORPORACIÓN		
#Sample	Metric	Value
T1P1_T1	Weighted NSTI	0.1917331239184284
T1P2_T1	Weighted NSTI	0.19769268342786894
T1P3_T1	Weighted NSTI	0.20093729885744854
T2P1_T1	Weighted NSTI	0.19359450410217785
T2P2_T1	Weighted NSTI	0.19273809093002478
T2P4_T1	Weighted NSTI	0.1885792499385644
T3P1_T1	Weighted NSTI	0.1982202201951523
T3P3_T1	Weighted NSTI	0.19328811977428292
T3P4_T1	Weighted NSTI	0.1954898744925123
T4P1_T1	Weighted NSTI	0.19627945922533235
T4P2_T1	Weighted NSTI	0.19585817769497205
T4P4_T1	Weighted NSTI	0.19884919175754992

NSTI ETAPA FLORACIÓN		
#Sample	Metric	Value
T1P1_T2	Weighted NSTI	0.12357947179026342
T1P2_T2	Weighted NSTI	0.11430069953618165
T1P3_T2	Weighted NSTI	0.12402481600475944
T2P1_T2	Weighted NSTI	0.09533343779118429
T2P2_T2	Weighted NSTI	0.1060777650304237
T2P4_T2	Weighted NSTI	0.10750537524327464
T3P1_T2	Weighted NSTI	0.11038220779177386
T3P3_T2	Weighted NSTI	0.10960376461940703
T3P4_T2	Weighted NSTI	0.11831827513117267
T4P1_T2	Weighted NSTI	0.13689504933172178
T4P2_T2	Weighted NSTI	0.12265127741007498
T4P4_T2	Weighted NSTI	0.11932886402624077

NSTI ETAPA FINAL		
#Sample	Metric	Value
T1P1_T3	Weighted NSTI	0.16956885192524382
T1P2_T3	Weighted NSTI	0.17860841935496122
T1P3_T3	Weighted NSTI	0.17896384206626517
T2P1_T3	Weighted NSTI	0.17144294868254908
T2P2_T3	Weighted NSTI	0.16844027104755285
T2P4_T3	Weighted NSTI	0.1732235194655961
T3P1_T3	Weighted NSTI	0.1773873312922953
T3P3_T3	Weighted NSTI	0.164783395620508
T3P4_T3	Weighted NSTI	0.17311313171730283
T4P1_T3	Weighted NSTI	0.17120817553098358
T4P2_T3	Weighted NSTI	0.17162458495232688
T4P4_T3	Weighted NSTI	0.1735801898969678

* T1: Tratamiento de cobertura del terreno con tamo de arroz inoculado con el consorcio de degradación, T2: Tratamiento de incorporación del tamo de arroz inoculado con el consorcio de degradación, T3: Tratamiento de quema y T4: Tratamiento de cobertura con tamo de arroz. Las letras P1-P4 representan cada una de las parcelas del tratamiento.

Bibliografía

- Acharya, C. L., Hati, K. M., & Bandyopadhyay, K. K. (2005). MULCHES. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 521–532. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00250-2>
- Adamchuk, V. I., Ferguson, R. B., & Hergert, G. W. (2010). Soil Heterogeneity and Crop Growth. In *Precision Crop Protection - the Challenge and Use of Heterogeneity* (pp. 3–16). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9277-9_1
- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of B-glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(3), 794–807. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Ahn, J.-H., Song, J., Kim, B.-Y., Kim, M.-S., Joa, J.-H., & Weon, H.-Y. (2012). Characterization of the bacterial and archaeal communities in rice field soils subjected to long-term fertilization practices. *Journal of Microbiology*, 50(5), 754–765. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2409-6>
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4), 394–404. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0606-4>
- American Society of Plant Biologists. (2018). New approach to improve nitrogen use, enhance yield, and promote flowering in rice: Expression of the nitrate transporter gene OsNRT1.1A improves yield and accelerates maturation. *The Plant Cell*, 30(3), 638–651. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00809>
- Andrews, S. (2010). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Retrieved from <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Anguria, P., Chemining'wa, G. N., Onwonga, R. N., & Ugen, M. A. (2017). Decomposition and Nutrient Release of Selected Cereal and Legume Crop Residues. *Journal of Agricultural Science*, 9(6), 108. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n6p108>
- Awika, J. M. (2011). Major Cereal Grains Production and Use around the World. In *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion* (pp. 1–13). <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1089.ch001>
- BAO, Q., DING, L.-J., HUANG, Y., & XIAO, K. (2019). Effect of rice straw and/or nitrogen fertiliser inputs on methanogenic archaeal and denitrifying communities in a typical rice paddy soil. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 109(3–4), 375–386. <https://doi.org/10.1017/S1755691018000580>

- Bao, Q., Ju, X., Gao, B., Qu, Z., Christie, P., & Lu, Y. (2012). Response of Nitrous Oxide and Corresponding Bacteria to Managements in an Agricultural Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 76(1), 130. <https://doi.org/10.2136/sssaj2011.0152>
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., & García, C. (2008). Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma*, 147(3–4), 159–171. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2008.08.007>
- Belal, E. B. (2013). Bioethanol production from rice straw residues. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(1), 225–234. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100033>
- Bending, G. D., Putland, C., & Rayns, F. (2000). Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. *Biology and Fertility of Soils*, 31(1), 78–84. <https://doi.org/10.1007/s003740050627>
- Bending, G. D., Turner, M. K., Rayns, F., Marx, M.-C., & Wood, M. (2004). Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1785–1792. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2004.04.035>
- Berg, J. M. (Jeremy M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Bernard, L., Mougél, C., Maron, P.-A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., ... Ranjard, L. (2007). Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ¹³ C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, 9(3), 752–764. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01197.x>
- Bhattacharyya, P., & Barman, D. (2018). Crop Residue Management and Greenhouse Gases Emissions in Tropical Rice Lands. *Soil Management and Climate Change*, 323–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812128-3.00021-5>
- Bhattacharyya, P., Roy, K. S., Neogi, S., Adhya, T. K., Rao, K. S., & Manna, M. C. (2012). Effects of rice straw and nitrogen fertilization on greenhouse gas emissions and carbon storage in tropical flooded soil planted with rice. *Soil and Tillage Research*, 124, 119–130. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2012.05.015>
- Bijay-Singh, Shan, Y. H., Johnson-Beebout, S. E., Yadvinder-Singh, & Buresh, R. J. (2008). Chapter 3 Crop Residue Management for Lowland Rice-Based Cropping Systems in Asia. *Advances in Agronomy*, 98, 117–199. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00203-4)
- Bisen Neelam, R. C. P. (2017). Crop residues management option for sustainable soil health in rice-wheat system: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 5, 1038–1042. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/318959582_Crop_residues_management_option_for_sustainable_soil_health_in_rice-wheat_system_A_review

- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., ... Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>
- Bond, T. C., Doherty, S. J., Fahey, D. W., Forster, P. M., Berntsen, T., DeAngelo, B. J., ... Zender, C. S. (2013). Bounding the role of black carbon in the climate system: A scientific assessment. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 118(11), 5380–5552. <https://doi.org/10.1002/jgrd.50171>
- Bothe, H. (Hermann), Ferguson, S. J. (Stuart J., & Newton, W. E. (William E. (2007). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier.
- Breidenbach, B., & Conrad, R. (2015). Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. *Frontiers in Microbiology*, 5, 752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00752>
- Bremner, J. M. (1955). Studies on soil humic acids: I. The chemical nature of humic nitrogen. *The Journal of Agricultural Science*, 46(02), 247. <https://doi.org/10.1017/S002185960003999X>
- Brimacombe, R., & Stiege, W. (1985). Structure and function of ribosomal RNA. *The Biochemical Journal*, 229(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/bj2290001>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Caldwell, B. A. (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*, 49(6), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.06.003>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Camargo, J. A., & Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Carlsson, H., & Nordlander, E. (2010). Computational modeling of the mechanism of urease. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2010.

<https://doi.org/10.1155/2010/364891>

- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 278–288. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-06>
- Castillo, M., Mamaril, C., Paterno, E., Sanchez, P., Badayos, R., Sta. Cruz, P., & Quimbo, M. (2012). Soil chemical and physical properties with rice straw management during fallow period. *Philippine Journal of Crop Science*, 37, 15–16. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/327645078_Soil_Chemical_and_Physical_Properties_with_Rice_Straw_Management_During_Fallow_Period
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2007.02.005>
- Chen, H. (2014). Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose* (pp. 25–71). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7_2
- Chowdhury, N., & Chowdhury, N. (2016). Influence of Rice Straw Incorporation on the Microbial Biomass and Activity in Coastal Saline Soils of Bangladesh. *Open Journal of Soil Science*, 06(10), 159–173. <https://doi.org/10.4236/ojss.2016.610016>
- Christian, D. G., & Bacon, E. T. G. (1991). The effects of straw disposal and depth of cultivation on the growth, nutrient uptake and yield of winter wheat on a clay and a silt soil. *Soil Use and Management*, 7(4), 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1991.tb00877.x>
- Cruz Ramírez, C. A., Gómez Ramírez, L. F., & Uribe Vélez, D. (2017). Manejo biológico del tamo de arroz bajo diferentes relaciones C:N empleando co-inóculos microbianos y promotores de crecimiento vegetal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 47–62. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70168>
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- Dandeniya, W. S., & Thies, J. E. (2015). Rhizosphere Nitrification and Nitrogen Nutrition of Rice Plants as Affected by Water Management. *Tropical Agricultural Research*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.4038/tar.v24i1.7984>
- Delmont, T. O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I. M., Constancias, F., Simonet, P., ... Vogel, T. M. (2011). Accessing the Soil Metagenome for Studies of Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1315–1324. <https://doi.org/10.1128/AEM.01526-10>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... Andersen,

- G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Devereux, R. D., & Wilkinson, S. S. (2004). *AMPLIFICATION OF RIBOSOMAL RNA SEQUENCES - Book Chapter*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Retrieved from https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=103990&Lab=NHEERL
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W180–W188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Doerr, S. H., & Cerdá, A. (2005). Fire effects on soil system functioning: new insights and future challenges. *International Journal of Wildland Fire*, 14(4), 339. <https://doi.org/10.1071/WF05094>
- Dotaniya, M. L., & Meena, V. D. (2015). Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0297-0>
- Drake, D., Nader, G., & Forero, L. (2002). Feeding Rice Straw to Cattle. *University of California*, 8079, 1–18. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/237450148_Feeding_Rice_Straw_to_Cattle
- Eagle, A. J., Bird, J. A., Horwath, W. R., Linnquist, B. A., Brouder, S. M., Hill, J. E., & van Kessel, C. (2000). Rice Yield and Nitrogen Utilization Efficiency under Alternative Straw Management Practices. *Agronomy Journal*, 92(6), 1096. <https://doi.org/10.2134/agronj2000.9261096x>
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., ... Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), E911-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Erenstein, O. (2002). Crop residue mulching in tropical and semi-tropical countries: An evaluation of residue availability and other technological implications. *Soil and Tillage Research*, 67(2), 115–133. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(02\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(02)00062-4)
- Fageria, N. K. (2007). Green Manuring in Crop Production. *Journal of Plant Nutrition*, 30(5), 691–719. <https://doi.org/10.1080/01904160701289529>
- Falkowski, P. G., Fenchel, T., & DeLong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5879), 1034–1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Fedearroz, D., Gerente, D., Perfetti, M., Corral, D., Hernández, R., Subdirector, L., ...

- Bogotá, D. C. (2017). Boletín 4° CENSO NACIONAL ARROCERO. Retrieved from <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/censo-nacional-arrocero/boletin-tecnico-4to-censo-nacional-arrocero-2016.pdf>
- Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz). (2018). *Area, Producción y Rendimientos*. Bogotá. Retrieved from http://www.fedearroz.com.co/new/apr_public.php
- Feng, Y., & Balkcom, K. S. (2017). Nutrient Cycling and Soil Biology in Row Crop Systems under Intensive Tillage. *Soil Health and Intensification of Agroecosystems*, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805317-1.00011-7>
- Ferreira, E. P. B., & Martin-Didonet, C. C. G. (2012). Mulching and Cover Crops Effects on the Soil and Rhizosphere-associated Bacterial Communities in Field Experiment. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(3), 671–681. Retrieved from <http://jast.modares.ac.ir/article-23-7618-en.html>
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579–590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Filip, Z. (2002). International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00254-7)
- Flores, E., López-Lozano, A., & Herrero, A. (2015). Nitrogen Fixation in the Oxygenic Phototrophic Prokaryotes (Cyanobacteria): The Fight Against Oxygen. In *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 879–890). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch86>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). *Rice Market Monitor (RMM)*. Retrieved from <http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>
- Francioli, D., Schulz, E., Lentendu, G., Wubet, T., Buscot, F., & Reitz, T. (2016). Mineral vs. Organic Amendments: Microbial Community Structure, Activity and Abundance of Agriculturally Relevant Microbes Are Driven by Long-Term Fertilization Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1446. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01446>
- Gadde, B., Bonnet, S., Menke, C., & Garivait, S. (2009). Air pollutant emissions from rice straw open field burning in India, Thailand and the Philippines. *Environmental Pollution*, 157(5), 1554–1558. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2009.01.004>
- García-Orenes, F., Morugán-Coronado, A., Zornoza, R., Cerdà, A., & Scow, K. (2013). Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. *PloS One*, 8(11), e80522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080522>
- Gardner, T., Acosta-Martinez, V., Senwo, Z., Dowd, S. E., Gardner, T., Acosta-Martinez, V., ... Dowd, S. E. (2011). Soil Rhizosphere Microbial Communities and Enzyme Activities under Organic Farming in Alabama. *Diversity*, 3(3), 308–328.

- <https://doi.org/10.3390/d3030308>
- Geisseler, D., & Horwath, W. R. (2008). Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12), 3040–3048. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2008.09.001>
- Good, I. J. (1953). The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. *Biometrika*, 40(3/4), 237. <https://doi.org/10.2307/2333344>
- Gordon, J. K., & Brill, W. J. (1974). Derepression of nitrogenase synthesis in the presence of excess NH₄⁺. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 59(3), 967–971. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(74\)80074-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(74)80074-4)
- Guo, J., Liu, W., Zhu, C., Luo, G., Kong, Y., Ling, N., ... Guo, S. (2018). Bacterial rather than fungal community composition is associated with microbial activities and nutrient-use efficiencies in a paddy soil with short-term organic amendments. *Plant and Soil*, 424(1–2), 335–349. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3547-8>
- Guo, L., Zheng, S., Cao, C., & Li, C. (2016). Tillage practices and straw-returning methods affect topsoil bacterial community and organic C under a rice-wheat cropping system in central China. *Scientific Reports*, 6(1), 33155. <https://doi.org/10.1038/srep33155>
- Guo, T., Zhang, Q., Ai, C., Liang, G., He, P., & Zhou, W. (2018). Nitrogen enrichment regulates straw decomposition and its associated microbial community in a double-rice cropping system. *Scientific Reports*, 8(1), 1847. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20293-5>
- Haizel, K. A. (1989). Weed science in the tropics. Principles and practices. *Journal of Tropical Ecology*, 5(01), 126. <https://doi.org/10.1017/S0266467400003369>
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1081–1084. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1081>
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, 43(8), 1185–1207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16656902>
- Harris, J. A. (2007). Microbiological Methods for Assessing Soil Quality - Edited by J. Bloem, D.W. Hopkins & A. Benedetti. *European Journal of Soil Science*, 58(5), 1214–1215. https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00943_3.x
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Nahar, K., & Biswas, J. K. (2018). *Advances in rice research for abiotic stress tolerance*. (W. Publishing, Ed.). Chennai, India: Elsevier. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=fZt5DwAAQBAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Hayano, K. (1993). Protease activity in a paddy field soil: Origin and some properties. *Soil Science and Plant Nutrition*, 39(3), 539–546. <https://doi.org/10.1080/00380768.1993.10419794>

- Hayashi, K., Ono, K., Kajjura, M., Sudo, S., Yonemura, S., Fushimi, A., ... Tanabe, K. (2014). Trace gas and particle emissions from open burning of three cereal crop residues: Increase in residue moistness enhances emissions of carbon monoxide, methane, and particulate organic carbon. *Atmospheric Environment*, 95, 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2014.06.023>
- Henderson, S. L., Dandie, C. E., Patten, C. L., Zebarth, B. J., Burton, D. L., Trevors, J. T., & Goyer, C. (2010). Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2155–2164. <https://doi.org/10.1128/AEM.02993-09>
- Henriquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., & Nogales, R. (2014). *Agronomía costarricense. Agronomía Costarricense* (Vol. 38). nc-nd/3.0/. Retrieved from https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0377-94242014000100003&lng=en&nrm=iso
- Herath, H. M. I. K., Wickramasinghe, W. M. D. B., & Mapa, R. B. (2004). Use of effective micro-organisms (EM) and urea in accelerating the decomposition of rice straw. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 7, 62–68. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063024245>
- Hernández-León, R., Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/part/113931>
- Hussain, Q., Pan, G. X., Liu, Y. Z., Zhang, A., Li, L. Q., Zhang, X. H., & Jin, Z. J. (2012). Microbial community dynamics and function associated with rhizosphere over periods of rice growth. *Plant, Soil and Environment*, 58(No. 2), 55–61. <https://doi.org/10.17221/390/2010-PSE>
- International Rice Research Institute. (2013). *Rice almanac* (4th ed.). Los Baños: Global Rice Science Partnership 2013. https://doi.org/http://books.irri.org/9789712203008_content.pdf
- Isobe, K., & Ohte, N. (2014). Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling. *Microbes and Environments*, 29(1), 4–16. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME13159>
- Jangid, K., Williams, M. A., Franzluebbers, A. J., Sanderlin, J. S., Reeves, J. H., Jenkins, M. B., ... 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>
- Jensen, H. L., & Jensen, H. L. (1940). Nitrogen fixation and cellulose decomposition by soil microorganisms. I. Aerobic cellulose-decomposers in association with *Azotobacter*. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales.*, 65, 543–556. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/part/48124>

- Kadam, K. L., Forrest, L. H., & Jacobson, W. A. (2000). Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, *18*(5), 369–389. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00005-2)
- Kandeler, E., & Gerber, H. (1988). Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, *6*(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>
- Karaca, A., Cetin, S. C., Turgay, O. C., & Kizilkaya, R. (2010). Soil Enzymes as Indication of Soil Quality (pp. 119–148). https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_7
- Kausar, H., Sariah, M., Mohd Saud, H., Zahangir Alam, M., & Razi Ismail, M. (2010). Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *64*(7), 594–600. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2010.06.012>
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, *154*(2), 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Kennedy, C., Doetsch, N., Meletzus, D., Patriarca, E., Amar, M., & Iaccarino, M. (1994). Ammonium sensing in nitrogen fixing bacteria: Functions of the *lnB* and *lnD* gene products. *Plant and Soil*, *161*(1), 43–57. <https://doi.org/10.1007/BF02183084>
- Kimura, M., Miyaki, M., Fujinaka, K.-I., & Maie, N. (2001). Microbiota responsible for the decomposition of rice straw in a submerged paddy soil estimated from phospholipid fatty acid composition. *Soil Science and Plant Nutrition*, *47*(3), 569–578. <https://doi.org/10.1080/00380768.2001.10408420>
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, *58*(2), 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Kirti, R., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, *2*, 12–18. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/265865007_Review_on_latest_overview_of_proteases
- Knoblauch, R., Ernani, P. R., Deschamps, F. C., Gatiboni, L. C., Walker, T. W., Lourenço, K. S., ... Pegoraro, A. (2014). Rice straw incorporated just before soil flooding increases acetic acid formation and decreases available nitrogen. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, *38*(1), 177–184. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000100017>
- Kowalchuk, G. A., Yergeau, E., Leveau, J. H. J., Sessitsch, A., & Bailey, M. (2010). Plant-associated Microbial Communities. Retrieved from <http://nora.nerc.ac.uk/id/eprint/9205/>
- Kumar, A., Gaiind, S., & Nain, L. (2008). Evaluation of thermophilic fungal consortium for paddy straw composting. *Biodegradation*, *19*(3), 395–402. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9145-3>

- Kumar, K., & Goh, K. M. (1999). Crop Residues and Management Practices: Effects on Soil Quality, Soil Nitrogen Dynamics, Crop Yield, and Nitrogen Recovery. *Advances in Agronomy*, 68, 197–319. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60846-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60846-9)
- Laane, C., Krone, W., Konings, W., Haaker, H., & Veeger, C. (1980). Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. *European Journal of Biochemistry*, 103(1), 39–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6928406>
- Ladd, J. N., & Butler, J. H. A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1), 19–30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
- Lagos, L., Maruyama, F., Nannipieri, P., Mora, M. ., Ogram, A., & Jorquera, M. . (2015). Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini‒review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000042>
- Lal, R. (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environment International*, 31(4), 575–584. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2004.09.005>
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., ... Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Latt, Z. K., Yu, S. S., Kyaw, E. P., Lynn, T. M., Nwe, M. T., Mon, W. W., & Aye, K. N. (2018). Using Cellulolytic Nitrogen Fixing Bacterium, *Azomonas agilis* for Effective Degradation of Agricultural Residues. *The Open Microbiology Journal*, 12(1), 154–162. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010154>
- Lee, C. T., Ismail, M. N., Razali, F., Muhamad, I. I., Sarmidi, M. R., & Khamis, A. K. (2008). Application of effective microorganisms on soil and maize. *Journal of Chemical & Natural Resources Engineering*, 2, 1–13. Retrieved from <http://eprints.utm.my/id/eprint/12227/>
- LI, J., LI, Y., YANG, X., ZHANG, J., LIN, Z., & ZHAO, B. (2015). Microbial community structure and functional metabolic diversity are associated with organic carbon availability in an agricultural soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(12), 2500–2511. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61229-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61229-1)
- Li, P., Li, Y., Zheng, X., Ding, L., Ming, F., Pan, A., ... Tang, X. (2018). Rice straw decomposition affects diversity and dynamics of soil fungal community, but not bacteria. *Journal of Soils and Sediments*, 18(1), 248–258. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1749-6>
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 625–645. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00563.x>

- Limmer, C., & Drake, H. L. (1996). Non-symbiotic N₂-fixation in acidic and pH-neutral forest soils: Aerobic and anaerobic differentials. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(2), 177–183. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00118-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00118-2)
- Liu, C., Lu, M., Cui, J., Li, B., & Fang, C. (2014). Effects of straw carbon input on carbon dynamics in agricultural soils: a meta-analysis. *Global Change Biology*, 20(5), 1366–1381. <https://doi.org/10.1111/gcb.12517>
- Liu, X., Wang, H., Zhou, J., Hu, F., Zhu, D., Chen, Z., & Liu, Y. (2016). Effect of N Fertilization Pattern on Rice Yield, N Use Efficiency and Fertilizer-N Fate in the Yangtze River Basin, China. *PLOS ONE*, 11(11), e0166002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166002>
- Liu, Y., Wang, J., Liu, D., Li, Z., Zhang, G., Tao, Y., ... Chen, F. (2014). Straw Mulching Reduces the Harmful Effects of Extreme Hydrological and Temperature Conditions in Citrus Orchards. *PLoS ONE*, 9(1), e87094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087094>
- Lüdemann, H., Arth, I., & Liesack, W. (2000). Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 754–762. <https://doi.org/10.1128/aem.66.2.754-762.2000>
- Luo, X., Fu, X., Yang, Y., Cai, P., Peng, S., Chen, W., & Huang, Q. (2016). Microbial communities play important roles in modulating paddy soil fertility. *Scientific Reports*, 6(1), 20326. <https://doi.org/10.1038/srep20326>
- Maarastawi, S. A., Frindte, K., Linnartz, M., & Knief, C. (2018). Crop Rotation and Straw Application Impact Microbial Communities in Italian and Philippine Soils and the Rhizosphere of *Zea mays*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01295>
- Makoi, J., & Ndakidemi, P. (2008). Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 7(3), 181–191. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58355>
- Malhi, S. S., & Kutcher, H. R. (2007). Small grains stubble burning and tillage effects on soil organic C and N, and aggregation in northeastern Saskatchewan. *Soil and Tillage Research*, 94(2), 353–361. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2006.08.009>
- Mandal, K. G. (author), Misra, A. K. (author), Hati, K. M. (author), Bandyopadhyay, K. K. (author), Ghosh, P. K. (author), & Mohanty, M. (author). (2004). Rice residue-management options and effects on soil properties and crop productivity. *Food, Agriculture & Environment*, 2, 224–231. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FI2016100038>
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., & van Elsas, J. D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
- Marcondes de Souza, J. A., Carareto Alves, L. M., de Mello Varani, A., & de Macedo Lemos, E. G. (2014). The Family Bradyrhizobiaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 135–

- 154). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_253
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213–218. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.182>
- Matsumura, Y., Minowa, T., & Yamamoto, H. (2005). Amount, availability, and potential use of rice straw (agricultural residue) biomass as an energy resource in Japan. *Biomass and Bioenergy*, 29(5), 347–354. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2004.06.015>
- McLaughlin, O., Mawhood, R., Jamieson, C., & Slade, R. (2016). Rice Straw for Bioenergy: the Effectiveness of Policymaking and Implementation in Asia. *European Biomass Conference and Exhibition Proceedings*, 1540–1554. <https://doi.org/10.5071/24THEUBCE2016-4AV.3.20>
- Mcnabb, D. H., & Geist, J. M. (1979). Acetylene Reduction Assay of Symbiotic Nitrogen Fixation Under Field Conditions. *Ecology*, 60(5), 1070–1072. <https://doi.org/10.2307/1936873>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589–594. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2005.09.006>
- Mengel, K. (1996). Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. *Plant and Soil*, 181(1), 83–93. <https://doi.org/10.1007/BF00011295>
- Miller, M. N., Dandie, C. E., Zebarth, B. J., Burton, D. L., Goyer, C., & Trevors, J. T. (2012). Influence of carbon amendments on soil denitrifier abundance in soil microcosms. *Geoderma*, 170, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.11.022>
- Ministerio de Agricultura y desarrollo rural, Ministerio de ambiente, vivienda y territorial. RESOLUCIÓN 510 DE 2007, Pub. L. No. 510 DE 2007, 46.585 (2007).
- Minomo, K., Ohtsuka, N., Nojiri, K., Hosono, S., & Kawamura, K. (2011). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in rice straw smoke and their origins in Japan. *Chemosphere*, 84(7), 950–956. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.006>
- Miura, Y., & Kanno, T. (1997). Emissions of trace gases (CO₂, CO, CH₄, and N₂O) resulting from rice straw burning. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(4), 849–854. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.10414651>
- Mousavi, S. F., Moazzeni, M., Mostafazadeh-Fard, B., & Yazdani, M. R. (2012). Effects of Rice Straw Incorporation on Some Physical Characteristics of Paddy Soils. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14(5), 1173–1183. Retrieved from http://hehp.modares.ac.ir/browse.php?a_id=10382&sid=23&slc_lang=en
- Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., ... Peters, J. W. (2016). Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3698–3710.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>

- Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S., & Maberly, G. F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1324(1), 7–14. <https://doi.org/10.1111/nyas.12540>
- Muto, H., Saitoh, K., & Takizawa, Y. (1993). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in rice straw smoke generated by laboratory burning experiments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(3), 340–347. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428111>
- Naether, A., Foessel, B. U., Naegele, V., Wüst, P. K., Weinert, J., Bonkowski, M., ... Friedrich, M. W. (2012). Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7398–7406. <https://doi.org/10.1128/AEM.01325-12>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655–670. <https://doi.org/10.1046/J.1351-0754.2003.0556.X>
- Nayak, D. R., Babu, Y. J., & Adhya, T. K. (2007). Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aerobic Endoaquept planted to rice under flooded condition. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1897–1906. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2007.02.003>
- Ng, L. C., Sariah, M., Radziah, O., Zainal Abidin, M. A., & Sariam, O. (2016). Development of Microbial-Fortified Rice Straw Compost to Improve Plant Growth, Productivity, Soil Health, and Rice Blast Disease Management of Aerobic Rice. *Compost Science & Utilization*, 24(2), 86–97. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2015.1076750>
- Oanh, N. T. K., Bich, T. L., Tipayarom, D., Manadhar, B. R., Prapat, P., Simpson, C. D., & Liu, L.-J. S. (2011). CHARACTERIZATION OF PARTICULATE MATTER EMISSION FROM OPEN BURNING OF RICE STRAW. *Atmospheric Environment (Oxford, England : 1994)*, 45(2), 493–502. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.023>
- Ochoa Villarreal Marisol, E. A.-H., Vargas Arispuro Irasema and, & Martínez Téllez Miguel Ángel. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In *Polymerization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/46094>
- Ogbodo, E. N. (2011). Effect of crop residue on soil chemical properties and rice yield on an Ultisol at Abakaliki, Southeastern Nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 7(3), 13–18. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/284487372_Effect_of_crop_residue_on_soil_chemical_properties_and_rice_yield_on_an_Ultisol_at_Abakaliki_Southeastern_Nigeria
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Magaji, U., Hussin, G., Ramli, A., & Miah, G. (2016). Fermentation Quality and Additives: A Case of Rice Straw Silage. *BioMed Research International*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/7985167>
- Oren, A. (2014). The Family Rhodocyclaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 975–998). Berlin,

- Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_292
- Ott, T., van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., ... Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. *Current Biology*, 15(6), 531–535. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.01.042>
- Pajares, S., & Bohannan, B. J. M. (2016). Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1045. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01045>
- Pan, F., Li, Y., Chapman, S. J., & Yao, H. (2016). Effect of rice straw application on microbial community and activity in paddy soil under different water status. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 5941–5948. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5832-5>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pettit, N. M., Smith, A. R. J., Freedman, R. B., & Burns, R. G. (1976). Soil urease: Activity, stability and kinetic properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(6), 479–484. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90089-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90089-4)
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13, 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)
- Pinton, R., Varanini, Z., & Nannipieri, P. (2007). *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. Retrieved from <https://www.crcpress.com/The-Rhizosphere-Biochemistry-and-Organic-Substances-at-the-Soil-Plant/Pinton-Varanini-Nannipieri/p/book/9780849338557>
- Piotrowska-Długosz, A., & Wilczewski, E. (2014). Assessment of soil nitrogen and related enzymes as influenced by the incorporation time of field pea cultivated as a catch crop in Alfisol. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(12), 8425–8441. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4014-0>
- Pittol, M., Scully, E., Miller, D., Durso, L., Mariana Fiuza, L., & Valiati, V. H. (2018). Bacterial Community of the Rice Floodwater Using Cultivation-Independent Approaches. *International Journal of Microbiology*, 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/6280484>
- Ponnanaperuma, F. N. (1984). Straw on a source of nutrients for wetland rice. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XB8411352>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>

- Qin, S., Jiao, K., Lyu, D., Shi, L., & Liu, L. (2015). Effects of maize residue and cellulose-decomposing bacteria inocula on soil microbial community, functional diversity, organic fractions, and growth of *Malus hupehensis* Rehd. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *61*(2), 173–184. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.928927>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D590. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Quesada, A., Leganés, F., & Fernández-Valiente, E. (1997). Environmental Factors Controlling N₂ Fixation in Mediterranean Rice Fields. *Microbial Ecology*, *34*, 39–48. <https://doi.org/10.2307/4251502>
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, *321*(1–2), 341–361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>
- Rajaramamohan-Rao, V. (1976). Nitrogen fixation as influenced by moisture content, ammonium sulphate and organic sources in a paddy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *8*(5), 445–448. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90048-1)
- Reddy, K. R. (1982). Nitrogen cycling in a flooded-soil ecosystem planted to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, *67*(1–3), 209–220. <https://doi.org/10.1007/BF02182768>
- Reicosky, D. C., & Wilts, A. R. (2005). CROP-RESIDUE MANAGEMENT. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 334–338. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00254-X>
- Riches, D., Porter, I. J., Oliver, D. P., Bramley, R. G. V., Rawnsley, B., Edwards, J., & White, R. E. (2013). Review: soil biological properties as indicators of soil quality in Australian viticulture. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12034>
- Robertson, G. P., & Groffman, P. M. (2015). Nitrogen Transformations. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 421–446). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00014-1>
- Roberttson, G. P., & Groffman, G. M. (2015). Nitrogen transformations. In E. A. Paul (Ed.), *Soil microbiology, ecology, and biochemistry* (4th ed., pp. 421–446). Burlington. https://doi.org/https://lter.kbs.msu.edu/docs/robertson/Robertson_and_Groffman_2015_N_Transformations_SMEB.pdf
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, *454*(7206), 841–845. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Ruda de Schenquer, E. E., Mongiello, A., & Acosta, A. (2004). *Contaminacion y salud del suelo* (Ediciones UNL). Santa Fé, República de Argentina. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=GYWdzzyZp0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Satlewal, A., Agrawal, R., Bhagia, S., Das, P., & Ragauskas, A. J. (2018). Rice straw as a feedstock for biofuels: Availability, recalcitrance, and chemical properties. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 83–107. <https://doi.org/10.1002/bbb.1818>
- Schimel, J. P., & Bennett, J. (2004). NITROGEN MINERALIZATION: CHALLENGES OF A CHANGING PARADIGM. *Ecology*, 85(3), 591–602. <https://doi.org/10.1890/03-8002>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 303–310. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00067-3)
- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>
- Seck, P. A., Diagne, A., Mohanty, S., & Wopereis, M. C. S. (2012). Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security*, 4(1), 7–24. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0168-1>
- Shamseldin, A., Abdelkhalek, A., & Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71(2), 91–109. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0462-3>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sharma, P. K., & Mishra, B. (2001). Effect of Burning Rice and Wheat Crop Residues: Loss of N, P, K and S from Soil and Changes in the Nutrient Availability. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 49(3), 425–429. Retrieved from <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jisss&volume=49&issue=3&article=006>
- Shaw, L. J., Nicol, G. W., Smith, Z., Fear, J., Prosser, J. I., & Baggs, E. M. (2006). *Nitrosospora* spp. can produce nitrous oxide via a nitrifier denitrification pathway. *Environmental Microbiology*, 8(2), 214–222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00882.x>
- Shen, S. M., Pruden, G., & Jenkinson, D. S. (1984). Mineralization and immobilization of nitrogen in fumigated soil and the measurement of microbial biomass nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, 16(5), 437–444. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90049-X)
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Shukla, G., & Varma, A. (Ajit). (2011). *Soil enzymology*. Springer.
- Singh, Y.-S., Singh, B., Meelu, O., & Khind, C. (2000). Long-term Effects of Organic Manuring and Crop Residues on the Productivity and Sustainability of Rice-Wheat Cropping System in Northwest India. In R. G. IP Abrol, KF Bronson, JM Duxbury (Ed.), *Long-term soil fertility experiments in rice-wheat cropping systems* (pp. 149–162).

- Rice-Wheat Consortium for the Indo-Gangetic Plain. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/259571342_Long-term_Effects_of_Organic_Manuring_and_Crop_Residues_on_the_Productivity_and_Sustainability_of_Rice-Wheat_Cropping_System_in_Northwest_India
- 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>
- Strock, J. S. (2008). Ammonification. *Encyclopedia of Ecology*, 162–165. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00256-1>
- Sun, R., Guo, X., Wang, D., & Chu, H. (2015). Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle. *Applied Soil Ecology*, 95, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.010>
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1972). Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4), 479–487. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90064-8)
- Takahashi, S., Uenosono, S., & Ono, S. (2003). Short- and long-term effects of rice straw application on nitrogen uptake by crops and nitrogen mineralization under flooded and upland conditions. *Plant and Soil*, 251(2), 291–301. <https://doi.org/10.1023/A:1023006304935>
- Takakai, F., Kikuchi, T., Sato, T., Takeda, M., Sato, K., Nakagawa, S., ... Kaneta, Y. (2017). Changes in the Nitrogen Budget and Soil Nitrogen in a Field with Paddy–Upland Rotation with Different Histories of Manure Application. *Agriculture*, 7(5), 39. <https://doi.org/10.3390/agriculture7050039>
- Tan, K. H. (Kim H. (2000). *Environmental soil science* (3rd ed.). Boca Ratón, Florida: M. Dekker. Retrieved from https://books.google.com.co/books/about/Environmental_Soil_Science_Third_Edition.html?id=bqn-rlVmz4IC&redir_esc=y
- Thamdrup, B. (2012). New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 407–428. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145048>
- Thissen, D., Steinberg, L., & Kuang, D. (2002). Quick and Easy Implementation of the Benjamini-Hochberg Procedure for Controlling the False Positive Rate in Multiple Comparisons. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 27(1), 77–83. <https://doi.org/10.3102/10769986027001077>
- Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 782–787. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317046>
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240–245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)

- Tung, N. S., Cự, N. X., & Hai, N. (2014). Impact of rice straw burning methods on soil temperature and microorganism distribution in the paddy soil ecosystems. *ARPJN Journal of Agricultural and Biological Science*, 9(5), 157–160. Retrieved from http://www.arpnjournals.com/jabs/volume_05_2014.htm
- Unger, I. M., Kennedy, A. C., & Muzika, R.-M. (2009). Flooding effects on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2009.01.007>
- Vaishampayan, A., Sinha, R. P., Hader, D.-P., Dey, T., Gupta, A. K., Bhan, U., & Rao, A. L. (2001). Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review*, 67(4), 453–516. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>
- Van Es, H. (2017). A New Definition of Soil. *CSA News*, 62(10), 20. <https://doi.org/10.2134/csa2017.62.1016>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Coconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2012). Soil Bacterial Diversity Screening Using Single 16S rRNA Gene V Regions Coupled with Multi-Million Read Generating Sequencing Technologies. *PLoS ONE*, 7(8), e42671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042671>
- Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A., & Knight, R. (2013). EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>
- Veum, K. S., Goyne, K. W., Kremer, R. J., Miles, R. J., & Sudduth, K. A. (2014). Biological indicators of soil quality and soil organic matter characteristics in an agricultural management continuum. *Biogeochemistry*, 117(1), 81–99. <https://doi.org/10.1007/s10533-013-9868-7>
- Vranova, V., Rejsek, K., & Formanek, P. (2013). Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology*, 70, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>
- Wang, J., Song, Y., Ma, T., Raza, W., Li, J., Howland, J. G., ... Shen, Q. (2017). Impacts of inorganic and organic fertilization treatments on bacterial and fungal communities in a paddy soil. *Applied Soil Ecology*, 112, 42–50. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.01.005>
- Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., & Glass, A. (1993). Ammonium Uptake by Rice Roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ Influx across the Plasmalemma). *Plant Physiology*, 103(4), 1259–1267. <https://doi.org/10.1104/pp.103.4.1259>
- Wang, W., Lai, D. Y. F., Wang, C., Pan, T., & Zeng, C. (2015). Effects of rice straw incorporation on active soil organic carbon pools in a subtropical paddy field. *Soil and Tillage Research*, 152, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2015.03.011>
- Wang, Y., Xu, L., Gu, Y. Q., & Coleman-Derr, D. (2016). MetaCoMET: a web platform for discovery and visualization of the core microbiome. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(22), 3469–3470. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw507>

- Ward, B. B. (2013). Nitrification. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 351–358). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Ward, B. B., & Jensen, M. M. (2014). The microbial nitrogen cycle. *Frontiers in Microbiology*, 5, 553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00553>
- Ward, N. L., Challacombe, J. F., Janssen, P. H., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Wu, M., ... Kuske, C. R. (2009). Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2046. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-08>
- Watanabe, A., Machida, N., Takahashi, K., Kitamura, S., & Kimura, M. (2004). Flow of photosynthesized carbon from rice plants into the paddy soil ecosystem at different stages of rice growth. *Plant and Soil*, 258(1), 151–160. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000016545.36421.bc>
- Watanabe, K., & Hayano, K. (1993). Distribution and identification of proteolytic *Bacillus* spp. in paddy field soil under rice cultivation. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(7), 674–680. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364803>
- Weber, S., Stubner, S., & Conrad, R. (2001). Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1318–1327. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1318-1327.2001>
- Wei, T., Zhang, P., Wang, K., Ding, R., Yang, B., Nie, J., ... Han, Q. (2015). Effects of Wheat Straw Incorporation on the Availability of Soil Nutrients and Enzyme Activities in Semiarid Areas. *PLOS ONE*, 10(4), e0120994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120994>
- Willems, A. (2014). The Family Comamonadaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 777–851). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_238
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>
- Wu, M., Qin, H., Chen, Z., Wu, J., & Wei, W. (2011). Effect of long-term fertilization on bacterial composition in rice paddy soil. *Biology and Fertility of Soils*, 47(4), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0535-z>
- Y. Chen, Y., S. Tessier, S., C. Cavers, C., X. Xu, X., & F. Monero, F. (2005). A SURVEY OF CROP RESIDUE BURNING PRACTICES IN MANITOBA. *Applied Engineering in Agriculture*, 21(3), 317–323. <https://doi.org/10.13031/2013.18446>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, S., Wang, Y., Liu, R., Xing, L., & Yang, Z. (2018). Improved crop yield and reduced nitrate nitrogen leaching with straw return in a rice-wheat rotation of Ningxia irrigation

- district. *Scientific Reports*, 8(1), 9458. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27776-5>
- Yi, X., Yuan, J., Zhu, Y., Yi, X., Zhao, Q., Fang, K., & Cao, L. (2018). Comparison of the Abundance and Community Structure of N-Cycling Bacteria in Paddy Rhizosphere Soil under Different Rice Cultivation Patterns. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3772. <https://doi.org/10.3390/ijms19123772>
- Ying-Hua, D., Ya-Li, Z., SHEN, Q.-R., & Song-Wei, W. (2006). Nitrate Effect on Rice Growth and Nitrogen Absorption and Assimilation at Different Growth Stages. *Pedosphere*, 16(6), 707–717. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60106-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60106-9)
- Zaneveld, J. R., Lozupone, C., Gordon, J. I., & Knight, R. (2010). Ribosomal RNA diversity predicts genome diversity in gut bacteria and their relatives. *Nucleic Acids Research*, 38(12), 3869–3879. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq066>
- Zeng, H., Lu-sheng, Liao, Min, Chen, Cheng-li, ... Chang-yong. (2005). Variation of Soil Microbial Biomass and Enzyme Activities at Different Growth Stages of Rice (*Oryza sativa*) . *Rice Science*, 12(4), 283–288. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Variation-of-Soil-Microbial-Biomass-and-Enzyme-at-Zeng-Lu-sheng/1a9d96781de487d7b005f96a127ebe7157af7a80>
- Zhan, Y., Liu, W., Bao, Y., Zhang, J., Petropoulos, E., Li, Z., ... Feng, Y. (2018). Fertilization shapes a well-organized community of bacterial decomposers for accelerated paddy straw degradation. *Scientific Reports*, 8(1), 7981. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26375-8>
- Zhang, B., Pang, C., Qin, J., Liu, K., Xu, H., & Li, H. (2013). Rice straw incorporation in winter with fertilizer-N application improves soil fertility and reduces global warming potential from a double rice paddy field. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1039–1052. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0805-7>
- Zhou, S., Nakashimada, Y., & Hosomi, M. (2009). Nitrogen transformations in vertical flow systems with and without rice (*Oryza sativa*) studied with a high-resolution soil–water profiler. *Ecological Engineering*, 35(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.04.014>