



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz**

**Vanessa Otero Jiménez**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2021



# **Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz**

**Vanessa Otero Jiménez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Ph.D. en Ciencias - Biología**

Director:

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Codirector:

Ph.D. Emiliano Rodríguez

Línea de Investigación: Ecología microbiana

Grupo de Investigación: Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2021



*A Mapasawa*



## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Vanessa Otero Jiménez

Fecha 26/08/2021

## Agradecimientos

Ha tomado un largo tiempo este viaje, mucho más del que hubiera querido y faltarían hojas para nombrar y agradecer a todas las personas con quienes he viajado, las que me han acompañado, apoyado y aún hoy día continúan haciéndolo incluso desde la distancia.

A mi señor y mi señora, mis días más tristes fueron solo superados gracias a su amor por mí.

A quién más sino mi gran agradecimiento a mi familia, mi mamá, mi papá, mi hermana y mi hermano, los que me apoyan en mis días felices, pero especialmente por todo el apoyo en mis días grises, en esos que no hay consuelo, en los días de cansancio, de dolor, en los días en que quise renunciar a todo, a ustedes les debo esto y más. Ustedes son mi sostén, mi pilar, mi fortaleza, los amo infinitamente.

La primera persona de este viaje a quien quiero agradecer es al Prof. Daniel Uribe-Vélez, mi director/supervisor/tutor. Gracias por aceptarme como su estudiante, por confiar en mí, por apoyarme en la fase de campo, por pedir siempre más, por la paciencia y astucia al lidiar con la parte de mí que ni yo conocía y que espero no vuelva a aparecer. Muchas gracias por el tiempo invertido en revisar los proyectos de Colciencias (Minciencias) y Hermes con los que desarrolló esta tesis, los varios proyectos que hemos sometido, los resúmenes para participar en congresos, las múltiples revisiones de los artículos. Gracias por su supervisión a través de estos años, guiándome, aconsejándome, señalándome dónde puedo y debo mejorar. Sin usted no estaría ahora aquí.

Estimado Prof. Emiliano Barreto, a usted muchas gracias como mi co-supervisor, su soporte en la bioinformática fue esencial para terminar este trabajo.

Quiero agradecer al Prof. Jan Dirck van Elsas y a la Universidad de Groningen por permitirme realizar la pasantía bajo su supervisión, porque esto amplió mi horizonte al ver e involucrarme en cómo se hace investigación en otra parte del mundo y por todo su apoyo

en la escritura del artículo publicado en conjunto, sus múltiples revisiones y comentarios nos ayudaron a repensar desde el lector y desde el evaluador.

También quiero agradecer al Prof. Rodrigo Mendes, a la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) y a Josiane Barros Chiaramonte porque, aunque la pasantía no se llevó a cabo de manera presencial, he contado con todo su apoyo, supervisión y contribución desde la distancia para avanzar en los análisis necesarios para el buen término de esta tesis y en la escritura del artículo en proceso.

Un especial agradecimiento con todo mi corazón a la Dra. Eiko Kuramae del The Netherlands Institute of Ecology (NIOO), por su confianza en mí y por el tiempo invertido en escuchar los resultados del proyecto y por sus valiosas contribuciones para mejorar esta investigación y el artículo, muchas gracias.

A mis maestros Salim, Quintanaso, Manu, CJMonto, Juanito y Juan, muchas gracias, sin su apoyo hoy no estaría aquí y puedo decir con toda seguridad sin temor a equivocarme que están felices de que hubiese llegado aquí.

A tres personas maravillosas que me permitieron que las acompañara en su camino, a través del desarrollo de sus proyectos, Laura Murillo, Pilar Carreño y David López. Laura te agradezco el hecho de apreciar que algunas cosas merecen todo nuestro tiempo, otras no. Pilar agradezco tu perseverancia, tu dedicación, tu agradecimiento infinito y por enseñarme a que es necesario poner límites. David agradezco tu paciencia, perseverancia y tu ánimo para siempre colaborar con quien lo necesita. A ustedes infinitas gracias por enseñarme tan variados conocimientos y acompañarme a transitar este camino.

Me gustaría agradecer a todos los miembros del Grupo de Investigación de Microbiología Agrícola, hemos compartido momentos inolvidables e historias de vida que nos llenan de valor para continuar en nuestro camino. Muchas gracias Karen Velandia, Luz Adriana Pedraza, Nicolás Rodríguez, Gloria Inés Leal, Kelly Piraquive, Paula Perea, Cata Camelo, Ana Mesa, Carlos Cruz, Luis Fernando Rodríguez, Fernanda Sánchez, Laura Boyacá, Laura Benavides, Lorena Miranda. A todos mis compañeros y amigos de antes, de ahora y de siempre muchas gracias por las risas, los abrazos, los almuerzos, los cafés, las cervezas y vinos, los bailes, y lo que vendrá.

A mis compañeras y amigas del IBUN, Elizabeth Mendes, Diana Vinchira, Viviana Ariza, Victoria Rodríguez, Jeimy Macías, muchas gracias por todo su apoyo, ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A mis administrativas favoritas Alejandra Cuellar, Yuly Escobar, Rocio Oliveros, Claudia Parra, Miryam Beltrán y Sonia Salamanca, porque gracias a ustedes todos los procesos son más ágiles, por su tiempo en escucharnos y aconsejarnos, por su apoyo, muchas gracias. Y especialmente a mi angelito Socorrito, sin tu apoyo no estaría aquí, desde donde estés todo mi amor para ti.

A todas las personas que conocí en las diferentes estaciones de este viaje, a las que conocí cuando viajé en bus, carro, avión, tren, a pie, a las estuve en este viaje, por una o varias estaciones, y a las que aún deciden viajar conmigo.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme expandir mi conocimiento, por ser mi refugio. Por el apoyo brindado a través de la convocatoria interna y apoyo No. 35834 para financiar este proyecto.

A Colciencias, actual Minciencias por el apoyo de la convocatoria #647 No.1101-714-51274, que permitieron la realización de este proyecto y permitieron que no lo abandonara.

Por último y no menos importante al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - IBUN, por permitirme desarrollar mi trabajo en sus instalaciones y por todo el equipo de profesores, compañeras y amigos que apoyaron mi paso en este gran viaje.

A todos, MUCHAS GRACIAS

## Resumen

### **Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz**

Los residuos agrícolas son precursores de la materia orgánica del suelo. Su descomposición en campo permite el ingreso de carbono y otros nutrientes al sistema, sin embargo, también puede favorecer la proliferación de patógenos. Entre las alternativas al manejo de los residuos se encuentran la quema, y su incorporación al suelo. Sin embargo, el impacto de las consecuencias de estas estrategias sobre la comunidad microbiana y su potencial funcional, es limitado. En este estudio se buscó determinar el efecto de la aplicación de cuatro estrategias de manejo de residuos sobre la estructura y función de las comunidades microbianas asociadas a los ciclos biogeoquímicos de carbono, nitrógeno y fósforo. Se implementó un ensayo en campo con un diseño de bloques incompletos al azar, haciendo toma de muestras de suelo en cuatro tiempos, durante un ciclo de cultivo, incluso desde la preparación del terreno previo a la siembra. Se caracterizó el suelo mediante análisis físico-químicos y enzimáticos, se describieron las comunidades microbianas usando secuenciación NGS, y se determinaron parámetros biológicos (productividad y el estado fitosanitario) del cultivo de arroz. Se identificó un efecto del manejo del tamo del arroz y el tiempo de muestreo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana especialmente en los tiempos de degradación y floración. Este estudio evidenció que las estrategias del uso del tamo ya sea en cobertura o incorporado con o sin la ayuda de microorganismos, son una opción adecuada para la disposición final del tamo de arroz.

**Palabras clave:** residuos agrícolas, degradación, enzimas, microorganismos, NGS, ciclos biogeoquímicos, tamo de arroz.

## **Abstract**

### **Determination of the effect of rice straw management on the structure and function of the microbial community in rice crop soils**

Agricultural residues are precursors of soil organic matter. Its decomposition in the field allows the entry of carbon and other nutrients into the system; however, it can also favor the proliferation of pathogens. Among the alternatives to waste management are, burning and, its incorporation into the soil. However, the impact of the consequences of these strategies on the microbial community and their functional potential is limited. This study sought to determine the effect of the application of four rice straw management strategies on the structure and function of the microbial communities associated with the biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, and phosphorus. A field trial was implemented with a random incomplete block design, taking soil samples four times, during a cultivation cycle, even from the preparation of the land prior to sowing. The soil was characterized by physicochemical and enzymatic analyzes, the microbial communities were described using NGS sequencing. Also, biological parameters (productivity and phytosanitary status) of the rice crop were determined. An effect of rice straw management and sampling time on the structure and function of the microbial community was identified, especially in degradation and flowering times. This study showed that the strategies of using the straw, either in mulch or incorporated in the soil with or without microorganisms, are an adequate option for the final disposal of the rice straw.

**Keywords: agricultural residues, degradation, enzymes, microorganisms, NGS, biogeochemical cycles, rice straw**

# Contenido

	Pág.
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 Cultivo de arroz y su residuo de cosecha .....	3
1.1.1 Producción del cultivo de arroz .....	3
1.1.2 Residuos de cosecha del cultivo de arroz (tamo de arroz) .....	4
1.1.3 Estrategia tradicional de manejo del tambo de arroz .....	4
1.1.4 Alternativas de manejo del tambo de arroz .....	5
1.1.5 Degradación del tambo de arroz.....	6
1.2 Diversidad microbiana y estructura de las comunidades asociadas al cultivo de arroz 8	
1.2.1 Estrategias para la identificación de comunidades microbianas.....	10
1.2.2 Comunidades microbianas en la semilla de arroz.....	10
1.2.3 Comunidades microbianas en la filósfera de arroz.....	11
1.2.4 Comunidades microbianas en la endosfera de arroz .....	12
1.2.5 Comunidades microbianas en la rizósfera de arroz .....	13
1.2.6 Comunidades microbianas en el suelo de soporte de cultivo de arroz.....	15
1.2.7 Nichos ecológicos presentes en el cultivo de arroz – caracterización funcional 16	
1.2.8 Diversidad microbiana asociada a la degradación de tambo de arroz.....	19
1.2.9 Actividades enzimáticas del suelo – importancia en la disponibilidad de nutrientes .....	21
1.3 Lineamiento general de la tesis.....	23
1.4 Preguntas de investigación .....	24
1.5 Hipótesis .....	24
1.6 Objetivo general .....	25
1.7 Objetivos específicos .....	25
1.8 Esquema de la tesis .....	26
<b>2. Metodología.....</b>	<b>27</b>
2.1 Área de estudio .....	27
2.2 Material biológico .....	27
2.3 Ensayo de campo.....	28
2.4 Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo de arroz .....	30
2.5 Análisis físico-químicos .....	30
2.6 Colección de muestras de suelo de soporte y suelo rizosférico.....	31
2.7 Objetivo 1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función potencial de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz .....	32
2.7.1 Extracción de DNA, amplificación del gen 16S e ITS y secuenciación.....	32
2.7.2 Procesamiento de secuencias 16S rRNA e ITS en tiempo de floración .....	32

## XIV **Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz**

---

2.7.3	Procesamiento de secuencias 16s rRNA en los tiempos inicial, degradación y final	35
2.7.4	Procesamiento de secuencias obtenidas por metagenómica (shotgun)	35
2.8	Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la actividad enzimáticas asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz	37
2.8.1	Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de carbono	37
2.8.2	Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del fósforo	38
2.8.3	Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del nitrógeno	39
2.9	Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz	40
2.9.1	Selección de genes indicadores y diseño y evaluación de cebadores	40
2.9.2	Elaboración de curva estándar para la cuantificación de secuencias a través de PCR en tiempo real	42
2.9.3	Evaluación y análisis de las muestras	43
2.10	Análisis estadísticos	44
2.10.1	Secuenciación dirigida y metagenómica	44
2.10.2	Actividades enzimáticas	46
2.10.3	Genes indicadores	47
<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>49</b>
3.1	Análisis físico-químicos	49
3.2	Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo	49
3.3	Objetivo 1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz	51
3.3.1	Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo rizosférico en tiempo de floración	51
3.3.2	Composición, estructura y función de la comunidad fúngica en suelo rizosférico en tiempo de floración	56
3.3.3	Estructura y composición de la comunidad bacteriana en suelo de soporte en los tiempos inicial, degradación y final	60
3.3.4	Análisis del potencial funcional a través de metagenómica de los suelos de soporte en los tiempos inicial, degradación y final	72
3.4	Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la actividad enzimáticas asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz	82
3.4.1	Carbono	82
3.4.2	Nitrógeno	87
3.4.3	Fósforo	92
3.5	Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz	95
3.5.1	Diseño y evaluación de cebadores	95
3.5.2	Estandarización por qPCR de los genes <i>amoA</i> (bacterias/arqueas) y <i>nifH</i> y curvas de calibración	97
3.5.3	Cuantificación por qPCR de la presencia del gen <i>amoA</i> , <i>nifH</i> en muestras de suelos de arroz	98

---

<b>4. Discusión.....</b>	<b>101</b>
4.1 Parámetros físico-químicos del suelo.....	101
4.2 Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo .....	103
4.3 Objetivo1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz .....	105
4.3.1 Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo rizosférico en tiempo de floración .....	105
4.3.2 Composición, estructura y función de la comunidad fúngica en suelo rizosférico en tiempo de floración .....	107
4.3.3 Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo de soporte en los tiempos inicial, degradación y final .....	110
4.3.4 Análisis del potencial funcional en los tiempos inicial, degradación y final ...	117
4.4 Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre las actividades enzimáticas asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz.....	125
4.4.1 Carbono.....	126
4.4.2 Fósforo .....	128
4.4.3 Nitrógeno .....	129
4.5 Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz .....	133
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>135</b>
5.1 Conclusiones.....	135
5.2 Recomendaciones.....	136

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Representación esquemática del proceso de desarrollo de la tesis.....	26
<b>Figura 2-1:</b> Representación esquemática de los procedimientos de manejo agrícola y períodos de muestreo realizados en el desarrollo del ensayo en campo.....	29
<b>Figura 2-2:</b> Diagrama de flujo de procesamiento de secuencias de 16S rRNA y de secuencias de ITS provenientes de tiempo de floración de suelo rizosférico y de secuencias de 16S rRNA de tiempo inicial, degradación y final provenientes de suelo de soporte....	34
<b>Figura 2-3:</b> Diagrama de flujo de procesamiento de datos metagenómicos siguiendo el protocolo propuesto por Carrión et al., (2019) con las modificaciones mencionadas en el texto y que se visualizan en este diagrama.....	36
<b>Figura 3-1:</b> Distribución de la estructura de la comunidad bacteriana ( $\beta$ -diversidad) en suelo rizosférico a tiempo de floración. ....	52
<b>Figura 3-2:</b> Core de la comunidad bacteriana.....	54
<b>Figura 3-3:</b> Predicción funcional bacteriana usando PICRUSt2. ....	55
<b>Figura 3-4:</b> Distribución de la estructura de la comunidad fúngica ( $\beta$ -diversidad) en suelo rizosférico a tiempo de floración.. ....	56
<b>Figura 3-5:</b> Core de la comunidad fúngica.....	58
<b>Figura 3-6:</b> Abundancia relativa de rasgos funcionales de la comunidad fúngica. ....	59
<b>Figura 3-7:</b> Índice de diversidad de Shannon en los tiempos inicial, degradación y final. ....	60
<b>Figura 3-8:</b> Diversidad alfa para la comunidad bacteriana de los tiempos inicial, degradación y final.....	61
<b>Figura 3-9:</b> Diversidad beta para la comunidad bacteriana de los tiempos inicial, degradación y final.....	62
<b>Figura 3-10:</b> Comparación de las distribuciones de los 28 filos presentes en la comunidad bacteriana de suelo de soporte en cada uno de los tratamientos.....	63
<b>Figura 3-11:</b> Comparación de las distribuciones de los 28 filos presentes en la comunidad bacteriana de suelo de soporte en los diferentes tiempos de muestreo. ....	64
<b>Figura 3-12:</b> Distribución de los diez taxones más abundante identificados a nivel de género en los diferentes tratamientos.. ....	65
<b>Figura 3-13:</b> Distribución de los diez taxones más abundante identificados a nivel de género en los diferentes tiempos. ....	66
<b>Figura 3-14:</b> Análisis discriminador lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-MMO .....	67

<b>Figura 3-15:</b> Análisis discriminatorio lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-IMO. ....	68
<b>Figura 3-16:</b> Análisis discriminatorio lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-B.....	69
<b>Figura 3-17:</b> Análisis de las comunidades que hacen parte del core microbioma .....	70
<b>Figura 3-19:</b> .....	72
<b>Figura 3-20:</b> Abundancia relativa de genes asociados a procesos metabólicos identificados en KEGG para cada uno de los tratamientos.....	74
<b>Figura 3-21:</b> Proporción de secuencias del potencial funcional identificado con KEGG.. ..	75
<b>Figura 3-22:</b> Metabolismo del nitrógeno reportado en KEGG. ....	75
<b>Figura 3-23:</b> Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis de los tratamientos y de los tiempos. ....	76
<b>Figura 3-24:</b> Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis de los tratamientos en cada uno de los tiempos. ....	77
<b>Figura 3-25:</b> Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-MMO en cada uno de los tiempos. ....	78
<b>Figura 3-26:</b> Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-IMO en cada uno de los tiempos.. ..	79
<b>Figura 3-27:</b> Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-B en cada uno de los tiempos. ....	80
<b>Figura 3-28:</b> Familias (a) CAZy GH35 ( $p = 0.027$ ) y (b) GH51 ( $p = 0.027$ ) las cuales presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-M en cada uno de los tiempos.....	81
<b>Figura 3-29:</b> Metabolismo del metano.....	81
<b>Figura 3-30:</b> Evaluación de la actividad $\beta$ -glucosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo.. ..	83
<b>Figura 3-31:</b> Evaluación de la actividad celulasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ....	84
<b>Figura 3-32:</b> Evaluación de la actividad $\beta$ -xilosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo para los tratamientos.. ..	85
<b>Figura 3-33:</b> Evaluación de la actividad $\beta$ -galactosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ....	86
<b>Figura 3-34:</b> Evaluación de la actividad proteasa en cada uno de los tiempos de muestreo.. ..	88
<b>Figura 3-35:</b> Evaluación de la actividad ureasa en cada uno de los tiempos de muestreo para los tratamientos.. ..	89
<b>Figura 3-36:</b> Evaluación de la actividad nitrogenasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ....	91

<b>Figura 3-37:</b>	Evaluación de la actividad fosfatasa ácida en cada uno de los tiempos de muestreo..	92
<b>Figura 3-38:</b>	Evaluación de la actividad fosfatasa alcalina en cada uno de los tiempos de muestreo.	94
<b>Figura 3-39:</b>	Abundancia de genes <i>amoA</i> de bacterias en el suelo de soporte en cada uno de los tiempos de muestreo.	98
<b>Figura 3-40:</b>	Abundancia de genes <i>amoA</i> de arqueas en el suelo de soporte en cada uno de los tiempos de muestreo..	99
<b>Figura 3-41:</b>	Abundancia de genes <i>nifH</i> en el suelo de soporte. Diferentes letras corresponden a diferencias estadísticas ANOVA–Tukey ( $p \leq 0.05$ ).	100

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Listado de cebadores y condiciones de ciclos térmicos empleados en PCR convencional para la amplificación de los genes de interés.....	41
<b>Tabla 3-1:</b> Efecto del manejo del tamo de arroz, sobre variables agronómicas e incidencia de patógenos.....	50
<b>Tabla 3-2:</b> Topología de las redes asociadas a cada tratamiento de estrategia de manejo del suelo.....	71
<b>Tabla 3-3:</b> Análisis de varianza de la actividad $\beta$ -glucosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	83
<b>Tabla 3-4:</b> Análisis de varianza de la actividad celulasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	84
<b>Tabla 3-5:</b> Análisis de varianza de la actividad $\beta$ -xilosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	86
<b>Tabla 3-6:</b> Análisis de varianza de la actividad $\beta$ -galactosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	87
<b>Tabla 3-7:</b> Análisis de varianza de la enzima proteasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	88
<b>Tabla 3-8:</b> Actividad de la enzima ureasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo..	90
<b>Tabla 3-9:</b> Actividad de la enzima nitrogenasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	91
<b>Tabla 3-10:</b> Actividad de la enzima fosfatasa ácida de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	93
<b>Tabla 3-11:</b> Actividad fosfatasa alcalina de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.....	94

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\alpha$	Diversidad alfa	$\alpha$	Diversidad alfa
$\beta$	Diversidad beta	$\beta$	Diversidad beta

### Superíndices

Superíndice	Término
n	Exponente, potencia
®	Marca registrada

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
BSA	Suero de Albúmina Bovina
g	Gravedades
h	Horas
ha	Hectáreas
min	Minutos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones Por Minuto
Seg	Segundos
TA	Tamo de arroz
Ton	Toneladas

# Introducción

El suelo es uno de los hábitats más diversos (Young and Crawford, 2004), donde los microorganismos del suelo desempeñan un papel fundamental en los diferentes ecosistemas relacionados con el ciclaje de nutrientes (Imchen et al., 2019).

Los residuos agrícolas se generan al momento de la cosecha y pueden alcanzar 1.5 veces la producción en términos de biomasa cosechada (Gupta et al., 2004), lo que los convierte en un reto para el productor que debe deshacerse de ellos para comenzar el siguiente ciclo de cultivo. La primera opción y la más rápida es la quema (Bhattacharyya & Barman, 2018; Yadvinder-Singh et al., 2005). Sin embargo, es la de mayor riesgo debido a los efectos secundarios que trae consigo como la generación de gases efecto invernadero (Abril et al., 2009; Gadde et al., 2009; Gupta et al., 2004; NAAS, 2017; Tipayarom & Oanh, 2007), daños en la salud por la inhalación de partículas (Gadde et al., 2009) y pérdida de los nutrientes almacenados en los residuos (Gupta et al., 2004).

Entre las alternativas a este manejo se encuentran su incorporación inmediata al suelo o dejarlo como cobertura sobre el terreno, permitiendo su degradación hasta el momento de la preparación del terreno donde serán incorporados para dar inicio al siguiente ciclo de cultivo. Ambas opciones pueden ir acompañadas o no de aplicación de inóculos microbianos que aceleren el proceso de degradación (Goyal & Sindhu, 2011).

Estos residuos son precursores de la materia orgánica del suelo. Su descomposición en campo permite el ingreso de carbono y otros nutrientes al suelo y es llevada a cabo de manera sinérgica por los microorganismos presentes en el suelo, en los residuos o los microorganismos aplicados como inóculos o la mezcla de todos ellos (Kuramae et al., 2013). Estos microorganismos conformados por bacterias y hongos (Murase y col., 2012; Weber et al., 2001), se encargan de la degradación de la materia orgánica mediante la producción de enzimas capaces de descomponer fuentes de carbono, tanto lábiles como recalcitrantes (Bowles et al., 2014). La producción de estas y otras enzimas son vitales en

las rutas metabólicas de los ciclos biogeoquímicos de los principales macronutrientes fundamentales para el desarrollo de las plantas. La introducción de estos residuos vegetales, así como de los microorganismos que ayudan en su degradación, pueden desencadenar cambios que afecten las comunidades microbianas presentes en el suelo y quizá en la producción del cultivo. De esta manera se hace necesario entender el efecto de la aplicación de las estrategias de manejo de residuos de cosecha sobre la estructura y función de las comunidades microbianas, así como sobre la producción y estatus fitosanitario del cultivo, uno de los factores más limitantes para la implementación de este tipo de estrategias por parte del agricultor.

En este contexto, este estudio buscó determinar el efecto de la aplicación de cuatro estrategias de manejo de residuos de cultivo de arroz (tamo de arroz) sobre la estructura y función de las comunidades microbianas asociadas a los ciclos biogeoquímicos de carbono, nitrógeno y fósforo. De igual forma se determinó su efecto sobre la productividad y el estado fitosanitario de un cultivo de arroz.

En esta tesis, se responderán las preguntas mencionadas, mediante la implementación de un ensayo en campo con un diseño de bloques incompletos al azar, en la cual se tomaron muestras de suelo de soporte y rizosférico, en cuatro tiempos: inicial, degradación, floración y final, siendo los dos primeros tiempos de muestreo, tomados antes de iniciar la preparación del terreno y antes de la siembra del ciclo de cultivo bajo análisis. Se realizaron análisis del suelo en términos de sus atributos fisicoquímicos, enzimáticos y la estructura de la comunidad microbiana a través de la secuenciación de próxima generación (metataxonómica y metagenómica) con el fin de identificar los perfiles taxonómicos y funcionales de la comunidad microbiana. Así mismo estos análisis se compararon con la producción y el estatus fitosanitario del cultivo, que son dos variables de gran importancia para el agricultor.

En las siguientes páginas se revisará a través de cinco capítulos los temas mencionados inicialmente, seguido por las preguntas de investigación, objetivos e hipótesis (capítulo 1), la metodología empleada en este trabajo (capítulo 2), los resultados obtenidos (capítulo 3), la discusión de los resultados (capítulo 4) y finalmente, presentaremos las conclusiones y recomendaciones (capítulo 5).

# 1. Marco teórico

## 1.1 Cultivo de arroz y su residuo de cosecha

### 1.1.1 Producción del cultivo de arroz

El arroz (*Oryza sativa L.*) es el tercer cereal más producido en el mundo después del maíz y el trigo (FAOSTAT, 2020), y un alimento básico para más de la mitad de la población mundial (Eyre et al., 2019; Pittol et al., 2018; Spence et al., 2014). Constituye el agroecosistema inundado de origen antropogénico más grande del planeta. Cerca del 50% del área de arroz sembrada a nivel global corresponde a áreas intensamente irrigadas (Ito et al., 1999), situación que se presenta igualmente en Colombia, donde el 55% de la producción del cultivo de arroz se realiza bajo sistemas de inundación por riego (Fedearroz, 2020).

Para el año 2019 la producción mundial fue de ~755 millones de toneladas, en un área cosechada de ~162 millones de ha. Dicha producción se encuentra liderada por países como China, India, Indonesia, y Vietnam (FAOSTAT, 2020). Colombia es el cuarto productor de las américas y ocupa el tercer lugar en Latinoamérica por debajo de Brasil y Perú (FAOSTAT, 2020).

En nuestro país el arroz ocupa el tercer lugar en producto nacional en términos de producción (Agronet, 2019). Para el año 2019 la producción fue de ~2.5 millones de toneladas en un área sembrada de 539.553 ha (Fedearroz, 2020). El 77% de la oferta de arroz, se obtuvo de las zonas llanos (43.61%) y centro (34.13%), siendo los departamentos de Tolima, Huila, Casanare y Meta los que lideran la producción (Fedearroz, 2020). Los costos de producir arroz en Colombia para el 2019 fueron de 6.3 millones de pesos por hectárea, donde el valor más alto (1.2 millones de pesos), corresponde al rubro de fertilizantes lo que representa el 19.3% del costo total de la producción, seguido del rubro de arriendo de lotes para la siembra (17.7%) (Fedearroz, 2020).

### **1.1.2 Residuos de cosecha del cultivo de arroz (tamo de arroz)**

Al finalizar el ciclo de cultivo en la producción de arroz, se genera un residuo conocido como tamo de arroz (TA), conformado por la parte no productiva de la planta como hojas, tallos, panículas vacías e incluso raíces (Knoblauch et al., 2014). La biomasa total y composición del TA dependerá de factores como la variedad, el manejo de nutrientes y el clima, entre otros (Van Hung et al., 2020).

Sin embargo, independientemente del sistema de fertilización empleado al momento de la cosecha se generan en promedio entre 1.0 a 1.5 toneladas de TA (Gupta et al., 2004). Los cereales generan dos terceras partes de la producción total de residuos de cosecha a nivel mundial (Bhattacharyya & Barman, 2018), donde la producción anual de TA alcanza más de 1.500 millones de toneladas a nivel mundial (Van Hung et al., 2020).

Las propiedades físicas del TA incluyen, capacidad calorífica, conductividad térmica y densidad, siendo esta la más importante debido a que representa el volumen que deberá ser reducido para una adecuada manipulación y disposición final en el suelo (Van Hung et al., 2020). Por su parte, la composición química del TA revela estructuras como la celulosa, hemicelulosa, lignina, lípidos, proteínas, azúcares simples, almidones, agua, entre otros (Jenkins M. et al., 1998), elevando su importancia como fuente de energía renovable para ser aplicada como enmienda del suelo (Bhattacharyya & Barman, 2018).

### **1.1.3 Estrategia tradicional de manejo del tamo de arroz**

En países tropicales la intensificación en los sistemas de cultivo de arroz, ha llevado a la implementación de variedades de ciclo corto con escaso tiempo de descanso entre los ciclos de cultivo, implementando de 2 a 2.5 y hasta tres ciclos por año (Lin & Fukushima, 2016; Quevedo Amaya et al., 2019). Esto convierte al TA en un gran reto para el productor, debido a que su recolección manual deriva en altos costos. La elección más rápida para eliminar el TA y preparar el campo para el siguiente ciclo de cultivo es entonces la quema (Bhattacharyya & Barman, 2018; Yadvinder-Singh et al., 2005)

Adicionalmente, el TA es considerado una fuente primaria de fitopatógenos (Takeuchi, 1987), por lo que se cree que la quema contribuye a la eliminación de patógenos. Sin embargo, el éxito de la quema en destruir el inóculo dependerá de la intensidad de la quema, influenciada a su vez por la cantidad de material a quemar, el contenido de

humedad, la calidad de los residuos, la velocidad del viento, la duración y temperatura durante la misma (Takeuchi, 1987).

La quema a campo abierto es un proceso de combustión incompleta debido a que la tasa de quema es mucho más alta que la entrada de oxígeno a la reacción (Bhattacharyya & Barman, 2018; Gadde et al., 2009), por lo que por cada tonelada de tamo quemado se liberan 199 Kg de cenizas, 60 Kg de CO, 1460 Kg de CO<sub>2</sub>, 2 Kg de SO<sub>2</sub>, 0.66% de CH<sub>4</sub> y 2.09% de N<sub>2</sub>O, conocidos gases de efecto invernadero (Abril et al., 2009; Gadde et al., 2009; Gupta et al., 2004; NAAS, 2017; Tipayarom & Oanh, 2007). Adicionalmente, se generan 20% de materia particulada y cerca de 50% de hidrocarburos aromáticos policíclicos como dioxinas y furanos debido a la acumulación de pesticidas en los tejidos; lo que genera daños en la salud humana y animal (Gadde et al., 2009).

Posterior a la quema se incorporan las cenizas al suelo a fin de restituir nutrientes (Navarrete et al., 2015). Sin embargo, la quema del TA genera pérdidas de los nutrientes almacenados en la planta, alrededor del 80% de nitrógeno (N), 25% de fósforo (P), 20% de potasio (K) y entre 5-60% de azufre (S), además de la eliminación del carbono (C) (Dobermann & Fairhurst, 2000). De igual forma, hay pérdida de microorganismos del suelo, destruye insectos benéficos y contribuye a la erosión del suelo (Gupta et al., 2004).

Todo esto se ve reflejado en pérdidas económicas debido a que esta entrada de materia orgánica que podría adicionalmente disminuir los costos de fertilizantes, no se aprovecha en su totalidad. Es así que la quema contribuye a la polución, al calentamiento global, a problemas de salud humana, animal y del suelo lo que la convierte en una alternativa ambientalmente insostenible (NAAS, 2017; Tipayarom & Oanh, 2007).

#### **1.1.4 Alternativas de manejo del tamo de arroz**

Desde los años 90 se han propuesto alternativas al manejo del TA como las *on-farm nonburning*. Estas alternativas buscan el reciclaje de nutrientes a través de la incorporación inmediata del TA o dejarlo como cobertura hasta su descomposición para ser después incorporado (Bhattacharyya & Barman, 2018).

La incorporación de TA asegura la adecuada nutrición de la planta ya que cuando se incorpora TA al suelo una cantidad considerable de nutrientes presentes en el TA pueden ser reciclados. Incorporar el 51% de 5.3 a 5.6 ton·ha<sup>-1</sup> de tamo de arroz, retorna 31-42 Kg

$\text{N ha}^{-1}$ ,  $8 \text{ Kg P ha}^{-1}$ ,  $34\text{-}61 \text{ Kg K ha}^{-1}$  y  $2.1\text{-}2.2 \text{ ton C ha}^{-1}$  por ciclo de cultivo (Hung et al., 2019). Disminuye el consumo de fertilizantes químicos, mejora el rendimiento del cultivo, mejora la calidad y estructura del suelo (Gupta et al., 2004; Nie et al., 2018), y la retención de agua (Reicosky & Wilts, 2005). Así mismo, reduce la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  por inmovilización de N (Bhattacharyya & Barman, 2018; Castilla, 2012; A. Dobermann & Fairhurst, 2002). Mientras a largo plazo incrementa la materia orgánica de suelo, el N total y la actividad biológica del suelo.

Hung y col. (2019) determinaron que la entrada de C al suelo dependía de la práctica de TA aplicada. En su estudio Hung y colaboradores evaluaron tres prácticas de manejo diferentes, encontrando que la mayor entrada de C al suelo se presentó con la incorporación de residuos de TA ( $\sim 2.1\text{-}2.2 \text{ ton ha}^{-1}$ ), seguido de la aplicación de compost de TA ( $788\text{-}831 \text{ Kg ha}^{-1}$ ), quedando en último lugar la incorporación de cenizas de TA quemado ( $53\text{-}56 \text{ Kg ha}^{-1}$ ), de esta manera se demostró que la entrada de C variaba de acuerdo con la práctica aplicada. En términos generales la incorporación incrementó el carbono orgánico (CO) del suelo (Hung et al., 2019) y cuando se aumenta el carbono orgánico se incrementa el secuestro de carbono (Chhabra & Mehta, 2019).

La incorporación directa del TA se relaciona también con inmovilización o reducida disponibilidad de nutrientes; reducción en la germinación de la semilla en el siguiente ciclo de cultivo (Knoblauch et al., 2014) y la posibilidad de incorporar fitopatógenos (Dobermann & Fairhurst, 2000). Cabe anotar que, si la descomposición se realiza de manera anaerobia, se produce metano ( $\text{CH}_4$ ) y otros gases efecto invernadero (El-Sobky, 2017), por lo que se recomienda una descomposición de mínimo tres (3) semanas de manera aerobia que permita contrarrestar los anteriores efectos y evitar la competencia por nutrientes con la comunidad microbiana del suelo (Knoblauch et al., 2014).

Estas prácticas son finalmente un reto y una oportunidad que contribuyen a una producción más económica y ecológicamente sostenible del cultivo de arroz, disminuyendo la huella climática.

### **1.1.5 Degradación del tamo de arroz**

El TA constituye una fuente rica en C (Guo et al., 2020), con 32-47% de celulosa, 19-27% de hemicelulosa, 5-12% de lignina y 3.3-5.7% de proteína (Binod et al., 2010). La celulosa

es un homopolisacárido de unidades  $\beta$ -glucosa con enlaces tipo  $\beta$ 1-4. La hemicelulosa por su parte incluye xiloglucanos, xilanos, mananos, glucomananos y  $\beta$ 1-3 y  $\beta$ 1-4 glucanos que interaccionan con la celulosa para dar rigidez a la planta; la lignina por su parte está compuesta de guayacil, siringil, y unidades de *p*-hidroxifenil fenilpropanoides de difícil degradación (Ambavaram et al., 2011). Su incorporación incrementa las concentraciones de carbono orgánico, de N del suelo y modula la calidad y cantidad de materia orgánica del mismo (Luo et al., 2016).

El radio C:N, ha sido identificado como una variable correlacionada con pérdida de masa durante las fases de degradación de la materia orgánica. Radios C:N bajos son indicativos de una rápida tasa de descomposición. En el caso del TA la relación C:N varía de 39 a 61 (Kumari et al., 2008), dependiendo por ejemplo de la variedad de la planta, lo que hace que la degradación sea bastante lenta. Esto aunado al alto contenido de silica y lignina retrasa el proceso de degradación (Gredner, 2010).

Según los estudios realizados por Van Holm y col. (1996), la descomposición del TA inicialmente es lenta, aunque aumenta con el tiempo. Bao y col (2020) por su parte cuando usaron bolsas de descomposición determinaron que, aunque la descomposición del tamo incrementa con el tiempo, esta se vuelve lenta a partir de la cuarta semana de incubación. Por otra parte, Eilan y col. (2001) y Phy y col. (2014), demostraron que la adición de ciertos nutrientes como N y sulfatos ( $\text{SO}_4$ ), pueden ayudar en la aceleración de la degradación de los polímeros naturales.

En la búsqueda de alternativas que ayuden en la degradación del TA, surgen estrategias eco-amigables. Una de estas estrategias es el uso de microorganismos (MO) o consorcios microbianos que aceleren la degradación del TA *in situ*, lo que permite transformar la materia orgánica del suelo (Kuramae et al., 2013).

Los MO empleados son generalmente bacterias, hongos lignocelulósicos o una mezcla de ambos. Una gran cantidad de hongos saprótrofos pertenecientes al filo *Ascomycota* como *Trichoderma* y *Penicillium* han sido reportados como microorganismos claves en la degradación de residuos de plantas (Pandey et al., 2009). De forma similar, bacterias de suelo como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Cellulomonas*, *Sphingobacterium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* y *Klebsiella spp.*, desempeñan un papel clave en la degradación de polisacáridos de origen vegetal como la hemicelulosa (Guo et al., 2020);

Jiménez, et al., 2014; Rawway et al., 2018). Estos MO no solo son aplicados como degradadores, sino también como agentes de control biológico, como es el caso de *Trichoderma* (Debode et al., 2018). Debido a los mecanismos de control biológico que posee, como la producción de metabolitos secundarios (antibiosis), la competencia y el micoparasitismo (Sood et al., 2020).

El uso de inóculos microbianos para mejorar la degradación de TA en suelo ha sido evaluado principalmente bajo condiciones de microcosmos. En este contexto, Goyal & Sindhu (2011) emplearon un consorcio microbiano de tres hongos (*Aspergillus awamorii*, *Paecilomyces fasisporus* y *Trichoderma viride*), para la degradación de TA por 90 días. Como resultado demostraron una disminución del CO en 17.4%, con incremento del ratio C:N, actividad enzimática y evolución del CO<sub>2</sub> en relación al control no inoculado.

De manera similar, Cruz-Ramírez y col., (2017) encontraron que el uso de un producto comercial compuesto por tres hongos *T. harzianum*, *T. koningii*, and *T. viride* (Fitotripen® Natural Control, Ltda) más la bacteria *Bacillus pumilus* (cepa IBUN 02717), pueden no solamente contribuir a la degradación de lignocelulosa sino que también mejora el crecimiento de las plantas (peso seco de raíz y tallo), cuando se aplicó a suelo enmendado bajo condiciones de invernadero. Esto debido a la actividad proteolítica de la bacteria IBUN 02717 y a la actividad celulolítica y hemicelulolítica del consorcio, así como a la actividad antagonica del *Trichoderma* frente a patógenos de arroz.

## **1.2 Diversidad microbiana y estructura de las comunidades asociadas al cultivo de arroz**

El microbioma ha sido definido de muchas formas, quizá la más adecuada puede ser la propuesta por Whipps y col. (1988), definido como la comunidad microbiana ocupando un hábitat bien definido, el cual tiene diferentes propiedades físico-químicas. En esta definición se tienen en cuenta la comunidad de MO involucrados, así como el “teatro de actividad” que incluye según Whipps y colaboradores los elementos estructurales microbianos (lípidos, proteínas/péptidos, polisacáridos, DNA/RNA) y los elementos estructurales externos compuestos por metabolitos microbianos (las moléculas orgánicas y de señalización, elementos génicos móviles, vestigios de DNA, y toxinas) y las condiciones ambientales, que finalmente forman un nicho ecológico específico.

En el microbioma asociado a plantas pueden coexistir microorganismos que generan efectos negativos (patógenos de plantas) o positivos (benéficos de plantas) o neutros (Mendes et al., 2013). Estas comunidades microbianas son esenciales para el crecimiento y salud de la planta, influyen en la germinación de la semilla, el vigor de las plántulas, el desarrollo, la nutrición y en el control de enfermedades, por esto contribuyen a mejorar la productividad y sostenibilidad de los cultivos (Mendes et al., 2013).

En el cultivo de arroz el microbioma puede ser transmitido de forma vertical a través de la semilla o de forma horizontal, adquirido (reclutado) desde el ambiente o a partir de los *hot spots* del suelo de soporte, es decir, zonas de incrementada actividad biológica como los microagregados (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015) y llegar a la rizósfera o a otros compartimentos de la planta (Shade et al., 2017). Las plantas pueden reclutar microorganismos a través de los exudados que producen (Yuan et al., 2018), alterando de esta manera el microbioma y seleccionando microorganismos que permitan la sobrevivencia frente a condiciones de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, el ensamblaje del microbioma dependerá de las relaciones entre los microorganismos, el huésped y el ambiente (Trivedi et al., 2020).

Es así que las plantas pueden seleccionar microorganismos promotores de crecimiento vegetal como fijadores de N, solubilizadores de P o K, degradadores de materia orgánica, productores de auxinas, entre otros, que tienen el potencial de mejorar el *fitness* de la planta incluso bajo estrés abiótico como la sequía (Santos-Medellín et al., 2017). De igual forma, la planta también puede reclutar microorganismos antagonistas que median en defensa de la planta a través de la producción de metabolitos secundarios, antibióticos o inducción de resistencia sistémica frente el estrés biótico generado por la presencia de fitopatógenos (Berendsen et al., 2012).

El microbioma de las plantas presenta una extraordinaria diversidad taxonómica (riqueza de especies), cumpliendo con funciones variadas como se mencionó anteriormente. En el caso de la presencia de un disturbio en el ecosistema en una escala temporal o espacial, los miembros de la comunidad pueden morir o cambiar sus abundancias relativas (Shade et al., 2012). Sin embargo, no necesariamente afectan los procesos ecosistémicos (función), debido a que el microbioma puede ser resistente, resiliente y/o funcionalmente redundante (Allison & Martiny, 2009). En el caso de no haber cambios en la composición de la comunidad a pesar de las variaciones originadas por el disturbio, se hablará de

resistencia. Será resiliente si a pesar de los cambios generados, la comunidad se recupera fácilmente. Por el contrario, si la composición de la comunidad cambia, pero a pesar de esto las funciones se mantienen se hablará de redundancia funcional (Allison & Martiny, 2009; Hubell, 2006; Louca et al., 2018).

### **1.2.1 Estrategias para la identificación de comunidades microbianas**

En aras de dilucidar el microbioma asociado al suelo del cultivo de arroz sea rizosférico o de soporte, se han empleado una gran variedad de estrategias. Los estudios más recientes, emplean técnicas como la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés), con dos aproximaciones, la metataxonómica y la metagenómica. En la metataxonómica se selecciona y secuencia un gen particular altamente conservado, como el 16S rRNA, que contiene regiones hipervariables las cuales evolucionan rápidamente y permiten identificar pequeñas diferencias entre cepas a nivel de género o especie, lo que permite describir la diversidad de la comunidad microbiana (Bukin et al., 2019); tal y como lo empleó Imchen y col., (2019) con el fin de determinar la comunidad rizosférica en campos de arroz durante diferentes etapas de crecimiento del cultivo. En la metagenómica, se secuencian todos los genes y genomas asociados a la muestra de suelo; esto genera información acerca de las funciones potenciales asociadas a determinado ecosistema, tal como lo hizo Li y col., (2018) quienes demostraron que la distribución a escala continental de la materia orgánica disuelta se encuentra significativamente correlacionada con el perfil taxonómico y el potencial metabólico del microbioma del suelo de arroz bajo inundación.

### **1.2.2 Comunidades microbianas en la semilla de arroz**

La semilla una vez plantada libera exudados ricos en C y N, por los cuales compiten los microorganismos habitantes de la semilla, la superficie de la misma y el suelo circundante conformando la espermósfera. En arroz se han asociado a la semilla géneros como *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* entre otros, asociados con promoción de crecimiento de plantas (Midha et al., 2016).

La semilla es una de las etapas más dinámicas del ciclo de vida de la planta y aunque se han realizado diversos estudios en semilla, la gran mayoría se enfoca en la comunidad de

bacterias, dejando de lado la comunidad de los hongos. En el estudio realizado por Eyre y col., con seis tipos de semilla de arroz de cultivar *japónica* cosechadas desde dos diferentes genotipos en cuatro compartimentos de la semilla (parte externa e interna de la cáscara, parte externa e interna de la semilla), establecieron que, los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* fueron lo más abundantes, donde la clase *Alfa-Proteobacteria* fue más abundante en la parte externa de la semilla mientras las *Gamma-Proteobacterias* lo fueron en la parte interna de la semilla. En cuanto a género, detectaron los géneros previamente mencionados, así como *Rhizobium*, *Aeurimonas*, *Atlantibacter* y *Franonibacter* (Eyre et al., 2019).

En el caso de hongos el filo *Ascomycota* con su clase *Dothidiomycetes* fueron los más abundantes incluyendo géneros como *Cladosporium*, *Cercospora*, *Alternaria* y *Curvulata*, mientras en los compartimentos externos se presentó un incremento en la abundancia de *Basidiomycota*; sin embargo, géneros como *Gibberella* y *Nigrospora* pertenecientes a la clase *Sordariomyctes* también fueron detectados (Eyre et al., 2019).

### 1.2.3 Comunidades microbianas en la filósfera de arroz

La filósfera definida como la porción de la planta por encima del suelo, es considerada un ambiente hostil, debido a la radiación ultravioleta, los cambios de temperatura estacionales o constantes en el trópico, así como la escasez de agua y nutrientes, principalmente C y N (Barrera et al., 2019; Müller & Ruppel, 2014).

El estudio metaproteómico de la filósfera del arroz desarrollado por Knief y col., (2012) reveló que las *Actinobacterias*, así como las *Alfa-* y *Beta-Proteobacterias* predominan este ambiente, con enriquecimiento en funciones relacionadas con respuesta a estrés. Por su parte, luego de estudiar la filósfera de 12 variedades de arroces provenientes de Filipinas y China, Roman-Reyna y col., encontraron que el microbioma de la filósfera de arroz en cuanto a composición (microorganismos presentes) y diversidad, es fuertemente influenciada por el genotipo y el ambiente de la planta y convergen en funciones metabólicas centrales. Mientras que la estructura de la comunidad microbiana es formada por las interacciones entre los microorganismos a través de redes y se conserva a pesar de las diferencias en la composición de esta.

En este mismo estudio los filos más abundantes asociados a la filósfera del arroz fueron *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes* y *Euryarchaeota*. Sin embargo, a nivel de género, encontraron diferencias siendo *Propionibacterium*, *Agrobacterium*, *Acidovorax* y *Enterobacter* más abundantes en los arroces provenientes de China, mientras *Xanthomonas* y *Serratia* se incrementaron en los arroces provenientes de Filipinas (Roman-Reyna et al., 2019). De igual forma, en este estudio se identificó a través de redes de co-ocurrencia tres géneros centrales, *hubs* o *key taxa* fuertemente conectados, *Clostridium*, *Mycoplasma* y *Helicobacter* (Roman-Reyna et al., 2019).

#### **1.2.4 Comunidades microbianas en la endosfera de arroz**

Los endófitos son microorganismos presentes dentro de los tejidos de las plantas, por al menos parte de su ciclo de vida sin causar enfermedad bajo cualquier circunstancia conocida (Hallmann et al., 1997; Le Cocq et al., 2017). Estos microorganismos influyen a la planta mediando en su respuesta frente a factores ambientales como escasez de nutrientes, patógenos, entre otros, (Hardoim et al., 2011; Sessitsch et al., 2012; Waqas et al., 2014).

Hardoim y col., en un estudio de la comunidad endofítica cultivable de plantas de arroz, en el que empleó semilla de dos generaciones consecutivas, demostraron que la semilla es una fuente de microorganismos endófitos que desempeñan un papel clave durante el desarrollo de la planta. Entre los endófitos reportó *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* y *Plantibacter*; mientras en tejido de tallos, encontró *Herbaspirillum* y *Pseudomonas* (Hardoim et al., 2011).

Por su parte Ferrando & Fernández, encontraron que los diazótrofos endofíticos de plantas de arroz cambian de acuerdo con el tratamiento hídrico (con y sin inundación). *Stenotrophomonas* (*Gamma-Proteobacteria*) estuvo presente en la condición sin inundación. Bajo inundación prevalecieron *Dechloromonas*, *Azospira*, *Uliginosibacterium* (*Beta-Proteobacteria*), *Geobacter* y *Desulfovibrio* (*Delta-Proteobacteria*), *Rhodopseudomonas*, *Magnetospirillum* y *Azospirillum* (*Alfa-Proteobacteria*), *Selenomonas* (*Firmicutes*) (Ferrando & Fernández Scavino, 2015).

## 1.2.5 Comunidades microbianas en la rizósfera de arroz

La rizósfera es definida como la zona estrecha que rodea y es influenciada por la raíz (Hiltner 1904). Las plantas se adaptan al ambiente suelo y activamente reclutan y nutren una colección de microorganismos a partir del suelo próximo, a través de la rizodeposición (Bacilio-Jiménez et al., 2003). La diversidad de microorganismos asociados a la planta son conocidos como el segundo genoma de la planta, el cual tiene un papel crucial en la salud de la planta, al tener efectos positivos o negativos sobre la planta hospedante (Mendes et al., 2013).

En un estudio de metataxonómica realizado por Edwards y col., demostraron que el microbioma de la rizósfera de arroz de plantas de seis semanas varía dependiendo de los rizo-compartmentos. En esta etapa la rizósfera es más parecida al suelo de soporte, pero diferente del microbioma endofítico (Edwards et al., 2015). De igual forma encontraron que la comunidad bacteriana asociada a la raíz varía dependiendo el estado de desarrollo de la planta (Edwards et al., 2015; Imchen et al., 2019; Wang et al., 2019). Esto es debido posiblemente a los exudados radiculares liberados por la planta en cada etapa de crecimiento (Aulakh et al., 2001). Similar a lo encontrado por Hussain y col., cuando empleó DGGE, para determinar la composición de la comunidad bacteriana y fúngica a través de las diferentes etapas de crecimiento de la planta (Hussain et al., 2012).

Edwards y col., identificaron colonizadores tempranos (*Burkholderiales*) y tardíos (*Rhodocyclales* y *SBl14*), que coincidían con el cambio de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva (Edwards et al., 2015). Relacionado posiblemente con las tasas de exudación de la planta que incrementan desde el estadio de plántula hasta la etapa de floración y disminuyen en la madurez. Así mismo el contenido de ácidos orgánicos incrementa, mientras el contenido de azúcares disminuye (Aulakh et al., 2001). En la etapa reproductiva el microbioma alcanza a estabilizarse (Imchen et al., 2019), teniendo un patrón de abundancia similar al suelo de soporte (Edwards et al., 2018).

En un estudio desarrollado por Pittol y col., (2018), identificaron la disminución de riqueza de microorganismos en la etapa reproductiva, lo que concuerda con Edwards y col., (2018). Adicionalmente, la etapa vegetativa estuvo dominada por microorganismos pertenecientes a *Gamma-Proteobacteria*, *Alfa-Proteobacteria*, y *Beta-Proteobacteria*. Por otro lado, en la

etapa reproductiva las clases dominantes fueron *Gamma-Proteobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia* y *Beta-Proteobacteria* (Pittol et al., 2018).

Otro de los factores implicados en la composición del microbioma de la rizósfera de arroz es el genotipo de la planta, relacionado quizá con las variaciones en la composición de los exudados de la raíz (Aulakh et al., 2001); así como la historia de cultivo del suelo (Edwards et al., 2019). De igual forma las prácticas de cultivo influyen en la composición del microbioma. Edwards y col., reportaron que en una práctica de *ecofarming* donde se emplean fertilizantes, fungicidas y herbicidas, pero donde está prohibido el uso de semillas transgénicas y fumigaciones post-cosecha, taxones como *Delta-Proteobacteria*, *Chloroflexi* y *Spirochaetes* incrementaron; esto en comparación con prácticas completamente orgánicas (Edwards et al., 2015).

Por su parte Breidenbach y Conrad (2015), demostraron que la comunidad de bacterias y arqueas es más abundante en la rizósfera que en el suelo circundante. Es importante recalcar que en la rizósfera de arroz los principales filos de arqueas son *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota* y *Eryarchaeota*, este último con representantes de los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (Conrad, 2007).

Los hongos no son muy comunes en ambientes inundados, sin embargo en la rizósfera de arroz, se encuentran representados por el filo *Chytridiomycota* con representantes de los géneros *Rhizophlyctis* y *Cladochytrium*, efectivos descomponedores de residuos vegetales como la celulosa, lo que contribuye al ciclo del C (Eichorst & Kuske, 2012). Adicionalmente, se han reportado hongos del género *Aspergillus* (Das, 1963) y algunos hongos micorrízicos arbusculares (AMF, por sus siglas en inglés), pertenecientes al filo *Glomeromycota* (Bernaola et al., 2018; Kanasugi et al., 2020; Sarkodee-Addo et al., 2020), los cuales están relacionados con la captura y solubilización de P, intervienen en la mejora frente al estrés biótico y abiótico, así como en la mejora de la estructura del suelo (Sarkodee-Addo et al., 2020; Wilson et al., 2009). Otros hongos de importancia, reportados en arroz son, *Chaetomiun*, conocido endófito de la raíz de plantas de arroz, *Pleosporales* y *Sordariomycetes*, identificados como patógenos (Kanasugi et al., 2020; M. Wang et al., 2020).

### **1.2.6 Comunidades microbianas en el suelo de soporte de cultivo de arroz**

El suelo es el ecosistema más biodiverso de la tierra (Young & Crawford, 2004). Compuesto por una fracción orgánica y otra inorgánica, donde ocurren procesos biogeoquímicos, movimiento de agua y difusión de gases que crean micro-sitios y gradientes (Paul & Clark, 1989). El suelo de soporte contribuye a la acumulación de materia orgánica y minerales, ciclaje de nutrientes, así como a la captura de agua y aire (Chaudhari et al., 2013).

Las comunidades microbianas de los suelos tiene un papel central en el funcionamiento de los mismos (Imchen et al., 2019). Actúan en procesos claves del suelo ya sea por incremento de la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos o el ciclaje de nutrientes (Kim & Lee, 2020), además de ser determinantes para la salud de la planta, del suelo y la fertilidad del mismo. Es importante señalar, que prácticas como, rotación de cultivo, labranza y tipo de labranza, fertilización e historia de uso del suelo (Yu et al., 2019), pueden afectar la diversidad microbiana del suelo e incluso tener efectos sobre la supresividad de enfermedades (Garbeva et al., 2004). Adicionalmente, ya que responden de manera rápida a cambios en el ambiente han sido seleccionados como indicadores de la calidad del suelo.

El estudio de las comunidades microbianas asociadas al suelo de soporte tiene en cuenta factores edáficos como por ejemplo los factores físico-químicos, siendo el pH clave en la conformación de la comunidad, puesto que afecta la concentración de otros iones y la capacidad de intercambio catiónico, así como el proceso redox (Yuan et al., 2019). Ejemplo de esto, es el estudio realizado por Yuan y col., (2019) en suelos de soporte de arroz sumergido, donde encontraron que la abundancia de arqueas se ve afectada con mayores temperaturas, mientras que las bacterias son afectadas por el contenido de materia orgánica y el contenido de N total. De igual forma encontraron que el pH del suelo fue el parámetro edáfico más importante que explica la  $\beta$ -diversidad tanto de bacterias como arqueas; sin embargo, las concentraciones de N proveniente del amonio, sulfato y cloruros también influyen en la conformación de la comunidad, aunque en menor medida (Yuan et al., 2019).

Ahora bien, en suelos de cultivo de arroz las comunidades bacterianas están típicamente conformadas por *Proteobacterias*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* y *Acidobacteria* (Hussain et al., 2012; X. Li et al., 2019). Mientras que la comunidad fúngica está conformada por *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Glomeromycota* (Yuan et al., 2018). A pesar de ser filos comunes a través de una amplia distribución geográfica, la variación en las comunidades bacterianas se debe principalmente a la heterogeneidad del suelo, el genotipo de la planta (Edwards, et al., 2015), o al período de cultivo. De igual forma, factores como el K disponible, la materia orgánica, la fertilización (Wang et al., 2019), la fuente de C y la fuente de energía son claves en los cambios de la comunidad microbiana ya que afectan la ecología y la dinámica de la población microbiana (Nannipieri et al., 2017).

En otro estudio Li y col., (2019), determinaron que la comunidad microbiana asociada a los cultivos de arroz cambia de acuerdo a la profundidad. En los primeros 0-20 cm el filo más abundante fue *Chloroflexi*, reconocidos degradadores primarios de polisacáridos, el cuál disminuyó a medida que aumentaba la profundidad. Contrario a lo que sucede con las *Actinobacterias* y *Acidobacterias* que aumentaron a medida que incrementaba la profundidad del suelo al ser oligotróficos.

### **1.2.7 Nichos ecológicos presentes en el cultivo de arroz – caracterización funcional**

Los suelos sumergidos de arroz se diferencian de otros, debido a que la mayor parte de la etapa de crecimiento de la planta se realiza bajo riego o inundación. El aerénquima cumple un papel importante al liberar oxígeno en la raíz, generando zonas óxicas circundadas de zonas anóxicas. Esta interface es colonizada por microorganismos aerobios, anaerobios, incluso anaerobios facultativos, fundamentales para los procesos biogeoquímicos como la oxidación de  $\text{NH}_4$  a  $\text{NO}_2$ , de sulfito a sulfato, hierro ferroso a férrico y de  $\text{CH}_4$  a  $\text{CO}_2$  (Liesack et al., 2000). Mientras en las zonas adyacentes procesos como la desnitrificación, reducción de hierro y sulfato, y la metanogénesis están presentes (Liesack et al., 2000).

Una importante característica de los suelos sumergidos de arroz es la emisión de gases efecto invernadero como el  $\text{CH}_4$  debido a la descomposición anaerobia de exudados de la raíz, detritos o materia orgánica como el TA (Conrad, 2009; Hernández et al., 2015). El cultivo de arroz es el responsable del 20% de las emisiones de  $\text{CH}_4$  a nivel agrícola (Van

Groenigen et al., 2011) y su producción está ligada al aumento de la temperatura y el CO<sub>2</sub> (Imchen et al., 2019).

La zona óxica-anóxica del cultivo, es un nicho para las poblaciones de metanógenos y metanotrofos perfectamente adaptadas a tal condición (Ding et al., 2019). La metanogénesis, es realizada exclusivamente por arqueas metanogénicas por la vía hidrogenotróficas o acetoclásticas (Conrad, 2007; Vaksmaa et al., 2017). Las arqueas pertenecientes al grupo I (*Methanosarcinaceae* y *Methanocellaceae*, Rice Cluster I), son el mayor grupo involucrado en la producción de este gas (Conrad, 2009).

En el estudio realizado por Hernández y col., en cultivos de arroz, identificaron la arquea metanogénica anaerobia estricta *Methanosaeta*, en una alta abundancia relativa en la rizósfera de arroz. Otras arqueas identificadas fueron *Methylomonas*, y *Methylococcales*. Los *Methylococcales* son metanotrofos aerobios activos, importantes en la mitigación hasta de un 20% de la emisión de CH<sub>4</sub> en cultivos de arroz (Hernández et al., 2015).

En otro estudio a través de las diferentes etapas del ciclo de cultivo de arroz, Imchen y col., (2019) encontraron que la población de arqueas a través del ciclo de cultivo estuvo predominada por *Methanosaeta*, *Methanocella* y *Methanobacterium* (Imchen et al., 2019), poblaciones similares a las reportadas previamente por otros investigadores (Breidenbach & Conrad, 2015). Adicionalmente, identificaron que la abundancia de metanógenos fue en declive hasta la etapa de cosecha (Imchen et al., 2019).

A la par del proceso de metanogénesis en el cultivo de arroz, también se desarrolla el proceso de metanotrofia. Los metanotrofos son responsables de oxidar el metano producido antes de que sea liberado a la atmósfera. En la rizósfera de arroz se han reportado metanotrofos como *Methylomonas*, *Methylobacteria*, *Methylosarcina* y *Methylocombium*, (metanotrofos tipo I) y *Methylocystis* (metanotrofos tipo II) (Conrad, 2007). En el estudio realizado por Imchen y col., (2019) en cultivo de arroz, reportaron una alta diversidad de metanotrofos tipo I, los cuales fueron enriquecidos con la edad de la planta, hasta el drenaje de los suelos. Sin embargo, el género *Methylocystis* fue el más abundante entre todos los metanotrofos. Mientras el género *Methalacidiphilum* fue identificado a través de todas las etapas del cultivo.

El metabolismo de metano, afecta otros ciclos de nutrientes como el N, ya que el metano puede inhibir el crecimiento y actividad de bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas* y

*Nitrosospora* (Zheng et al., 2014). Así mismo, la aplicación de fertilizantes es otro de los factores que influyen sobre los ciclos de nutrientes, por ejemplo, a bajas dosis de fertilizante nitrogenados los metanotrofos diazotróficos (bacterias metanotróficas tipo II) actúan como fijadores de N y oxidadores de CH<sub>4</sub> así, contribuyen a la acumulación de fuentes de C y N en suelos sumergidos de arroz (Minamisawa et al., 2016).

La oxidación aerobia de amonio a NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> se realiza vía nitrificación (Kuypers et al., 2018). Mientras que el NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> puede llegar hasta N<sub>2</sub> pasando por NO y N<sub>2</sub>O mediante el proceso de desnitrificación realizado por bacterias desnitrificadoras. La nitrificación es realizada por bacterias oxidadoras de amonio (AOB, por sus siglas en inglés), como *Nitrosospora* y *Nitrosomona* o arqueas oxidadoras de amonio (AOA, por sus siglas en inglés) como la *Thaumarchaeota* (Imchen et al., 2019).

Las AOA son más abundantes debido quizá a la adaptación a ambientes microaerófilos, siendo el género *Nitrosocaldus* el más dominante seguido por *Nitrososphaera* según lo reportado por Imchen y col., (2019). Mientras que en las AOB el género *Nitrosospora* fue el más dominante. Los microorganismos involucrados en este proceso se identifican porque son portadores del gen *amoA* (Hussain et al., 2012). La desnitrificación por su parte está mediada por las bacterias desnitrificadoras y sus representantes albergan todos o algunos de los siguientes genes: *nirK* (*Rhizobiales*) y *nirS* (*Burkholderiales* y *Rhodocyclales*) (Yoshida et al., 2009), *norB* y *nosZ* (Zhou et al., 2012).

Por su parte la oxidación anaerobia de amonio (anammox) se presenta porque hay una nitrificación o desnitrificación incompleta dejando NO<sub>2</sub> disponible para el proceso de anammox. Este proceso se ha reportado tanto para suelo de soporte como para suelo rizosférico en cultivos de arroz (Nie et al., 2015). Nie y col., reportaron un mayor número de bacterias anammox en la rizósfera, incluso dos veces mayor, en comparación con el suelo de soporte (Nie et al., 2015). Donde la familia *Planctomyceteceae* con sus representantes *Ca. Brocadia* y *Ca. Kuenenia* son los más abundantes (Nie et al., 2015). Otro de los procesos que son favorecidos en este tipo de suelos es la fijación biológica de N (Das et al., 2011) mediada por microorganismos diazotófos.

Posterior a la inundación de los suelos de arroz, la oxido-reducción de hierro ocurre inmediatamente. Bacterias como *Geobacter*, *Pelobacter* y *Anaeromyxobacter* son

identificadas en el suelo y reconocidas como reductoras de hierro. *Geobacter* especialmente puede suprimir la metanogénesis al competir por el acetato como sustrato en este tipo de suelos cuando se encuentra en bajas concentraciones (Hori et al., 2010).

En suelos de arroz, otro de los procesos biogeoquímicos identificados es la reducción de sulfato, donde los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfomonile* y *Syntrophobacter* han sido identificados (He et al., 2010). Estos microorganismos compiten con los metanógenos por el acetato incluso a bajas concentraciones de sulfato, por lo que pueden ser limitantes de la metanogénesis (Lee & Cho, 2004).

Por su parte, microorganismos como las *Acidobacterias* especialmente de la subdivisión 1, pueden jugar un papel importante en el ciclo de C en suelos de arroz. Esto es debido a su capacidad para descomponer sustratos complejos como xilano, hemicelulosa, celulosa y pectina siendo la familia *Koribacteracea* uno de sus representantes (Li et al., 2019). De igual forma *Ca. Koribacter*, *Ca. Solibacter* (acidobacterias) poseen genes que codifican para el uso de sustratos complejos como quitina, pectina, almidón, xilano y hemicelulosa, e incrementaron significativamente en un ensayo de retorno de tamo por largo tiempo (Yu et al., 2019).

Por último, el P es un nutriente esencial para la planta, sin embargo, cuando se aplica como fertilizante, es fácilmente fijado en el suelo y de esta manera no queda disponible para la planta. En suelos de cultivo de arroz, se han identificado microorganismos como *Geobacter*, *Gracilibacter*, *Variovorax*, entre otros (Yao et al., 2020). Estos microorganismos son conocidos como solubilizadores de fosfato y son portadores de genes que codifican para la solubilización de fosfato incluyendo gen *phoD* que codifica para la fosfatasa alcalina y el gen *appA* que codifica para la fosfatasa ácida (Ragot et al., 2015). Adicionalmente, estos microorganismos son productores de metabolitos como ácidos orgánicos que permiten la solubilización del fosfato fijado en los suelos.

### **1.2.8 Diversidad microbiana asociada a la degradación de tamo de arroz**

El suelo es un sistema estructurado, discontinuo y heterogéneo, generalmente pobre en nutrientes y fuentes de energía y con microorganismos viviendo en discretos microhábitats (Elsas et al., 2019), sin embargo como se mencionó anteriormente podemos encontrar *hot*

*spots* como los micro-agregados con diferentes propiedades físico-químicas y materia orgánica particulada acumulada (Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015).

Por otra parte, los componentes de las plantas son polímeros altamente complejos y diversos, por lo que su degradación requiere de la acción combinada de diferentes microorganismos entre hidrolíticos o celulolíticos, fermentadores, homoacetogénicos, bacterias sintróficas y arqueas metanogénicas acetoclásticas o hidrogenotróficas. La despolimerización y posterior mineralización de los productos lábiles por los microorganismos crea la base trófica para redes basadas en detritos y ciclaje de nutrientes (Burns et al., 2013).

La ecología microbiana del suelo es manipulada por la adición o disminución de materia orgánica al suelo (Bailey & Lazarovits, 2003). La materia orgánica influye en la estructura del suelo, por ende, afecta la aireación, drenaje de agua, mantenimiento de la humedad, disponibilidad de nutrientes y la ecología microbiana (Ekwue, 1990; Murphy, 2015; Walsh & McDonnell, 2012).

Es así que el manejo de residuos de cultivo impacta directamente sobre la salud de la planta y la productividad del cultivo (Bailey & Lazarovits, 2003). Siendo las comunidades microbianas fundamentales para mantener estos procesos ecosistémicos asociados con la descomposición de la materia orgánica. La descomposición de la materia orgánica en suelo ocurre de manera sucesional reflejando los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana y la biomasa fúngica. En el estudio realizado por Bao y col., determinaron que la comunidad bacteriana asociada a la descomposición del tamo varía a través de las diferentes etapas de descomposición debido a los cambios químicos que experimenta el TA (Bao et al., 2020).

Sugano y col., (2005) por su parte, encontraron que las *Beta-* y *Delta-Proteobacterias*, *Spirochaetas* y *Bacteroidetes*, dominaron los residuos de tamo en el suelo. Weber y col., por su parte en un estudio de DGGE encontraron que la comunidad microbiana asociada a la degradación del TA muestra cambios pronunciados en los primeros 15 días y posteriormente la comunidad tiende a estabilizarse. El género *Clostridium*, un degradador anaerobio fue de los más abundantes, mientras otros microorganismos involucrados en la degradación del TA fueron *Bacillus*, *Nitrosospira* y *Acidobacterium* (Weber et al., 2001).

En cuanto a los hongos, se sabe que dominan la descomposición del TA en suelos drenados, mientras los protistos dominan en suelos sumergidos. En este sentido Murase y col., (2012) en un estudio empleando  $^{13}\text{C}$  reportaron que en el filo hongo, los géneros *Mortierella* (*Mucormycotina*), *Gibberella*, *Fusarium* (*Ascomycota*) y *Syncephalis* (*Zoopagomycotina*), fueron los más abundantes. Mientras, *Pythium* (*Stramenopiles*) y *Polymyxa* (*Cercozoa*) fueron los protistos identificados.

### **1.2.9 Actividades enzimáticas del suelo – importancia en la disponibilidad de nutrientes**

Los nutrientes son necesarios para el propio funcionamiento de los organismos. Nutrientes como el C, N y P son requeridos en grandes cantidades, por lo que son conocidos como macronutrientes. Son fundamentales para el desarrollo de la planta debido a que intervienen en procesos como la fotosíntesis, transferencia de energía, degradación de materia orgánica, floración, entre otros. La disponibilidad de nutrientes, por tanto, influye en el rendimiento del cultivo.

Una característica distintiva del suelo es la presencia de moléculas biológicas como las enzimas. Las enzimas dependiendo de su localización pueden ser intracelulares o extracelulares. Las intracelulares se encuentran presentes dentro de la célula o ligadas a la pared de las células vivas y metabólicamente activas, células proliferativas o células muertas (Burns et al., 2013; Nannipieri, 2006). Las enzimas extracelulares son liberadas al suelo (Burns et al., 2013). Una vez secretadas, quedan atrapadas por sustancias húmicas o adsorbidas por partículas de arcilla (Nannipieri et al., 2003). Adicionalmente como se encuentran completamente inmovilizadas a través de interacciones iónicas o puentes covalentes, están protegidas contra la degradación, ya sea térmica, por pH o por proteólisis (Nannipieri et al., 2012), por lo que mantienen su actividad, incluso en condiciones limitantes de actividad microbiana (Burns et al., 2013).

Las enzimas de los microorganismos presentes en los suelos son claves en el proceso de reciclaje de materia orgánica a través de la mineralización o transformación de nutrientes ya que degradan fuentes de carbono complejas, desde lábiles hasta recalcitrantes, siendo vitales para iniciar o mantener los ciclos biogeoquímicos de nutrientes y mejorar la productividad agronómica (Bowles et al., 2014).

Las enzimas más importantes son las relacionadas con el ciclo del C, N, P y S. Las enzimas relacionadas con el ciclo de C son las encargadas de proveer la energía necesaria para el correcto funcionamiento de los organismos. Algunas de las enzimas que podemos encontrar en suelo son, la celulasa, involucrada en la descomposición de celulosa generando celodextrinas. La  $\beta$ -glucosidasa es la más común y predominante en suelo (Piotrowska & Koper, 2010), hidroliza enlaces glicosídicos de las celobiosas y celotriosas generando glucosa. Estas dos enzimas son importantes indicadores de la descomposición de materia orgánica como los residuos de cultivo (Eivazi & Tabatabai, 1988, 1990).

Por otra parte, las fosfatasa hidrolizan los puentes fosfo-éster en la matriz orgánica liberando fósforo inorgánico en forma de ortofosfatos. Se categorizan de acuerdo con el pH óptimo para su actividad y de acuerdo al número de puentes fosfo-éster hidrolizados. A mayor ortofosfato disponible menos enzimas se presentan (Nannipieri et al., 2011). Las bacterias producen principalmente fosfatasa alcalinas, mientras los hongos producen predominantemente fosfatasa ácida. La fosfatasa ácida muestra su máxima actividad a pH 6. Mientras la fosfatasa alcalina alrededor de pH 11.

La proteasa es importante en la mineralización de N orgánico en suelo. Las proteasas hidrolizan uniones de péptidos de proteínas y degrada proteínas para liberar pequeños péptidos, que continuarán degradándolos hasta convertirlo en amino ácidos, siendo fuentes de nitrógeno para los microorganismos (Ladd & Butler, 1972). La ureasa, hidroliza urea a amonio y dióxido de carbono, producida por los microorganismos y las raíces de algunas plantas. Esta enzima tiene una gran influencia sobre la dinámica del N en el suelo, ya que incrementa la concentración de nitrógeno amoniacal en suelo, aumentando de esta manera el pH del suelo cuando se fertiliza con urea (Ladd & Butler, 1972).

En los suelos la rizósfera es una zona donde los microorganismos son enriquecidos y por ende las actividades enzimáticas son más altas en la rizósfera que en el suelo de soporte (Gianfreda, 2015). Cabe aclarar que en suelos de soporte la actividad enzimática disminuye con el incremento de la profundidad del mismo. Las actividades enzimáticas en suelo se ven afectadas por el pH, la temperatura, materia orgánica de suelo, sistema de cultivo y practica de manejo de los suelos (Dotaniya et al., 2018; Deng & Tabatabai, 1994).

En el caso de los fertilizantes minerales, se sabe que su aplicación impacta de manera negativa en las actividades enzimáticas, por ejemplo, los fertilizantes nitrogenados disminuyen las poblaciones bacterianas de diazótrofos, mientras la aplicación de fosfato afecta el comportamiento de las micorrizas (Grant et al., 2005). En el caso de aplicación de compost o enmiendas orgánicas influyen de manera positiva al incrementar la biomasa microbiana y por ende la presencia la actividad enzimática, aunque dependiendo de la composición de la enmienda y la disponibilidad de los nutrientes en la misma (Böhme et al., 2005).

Diversos estudios han demostrado que la actividad enzimática puede ser usada como un indicador temprano de los cambios en las propiedades del suelo iniciado por las prácticas de manejo de los suelos (Utobo & Tewari, 2015; Zhang et al., 2015).

### **1.3 Lineamiento general de la tesis**

Hasta el momento se ha presentado un panorama que inicia con una gran problemática mundial, donde Colombia no es la excepción, se trata de la disposición final de los residuos agrícolas. Colombia es un país agrícola por excelencia, por lo que a su vez genera una gran cantidad de residuos agrícolas.

El agricultor entonces entra en una gran disyuntiva, la primera opción es aprovechar la ventaja de localización geográfica en el trópico que le permite realizar varios ciclos de cultivo al año en términos de ciclos de cultivo de arroz (Quevedo Amaya et al., 2019). Para lograrlo deberá deshacerse rápidamente de los residuos de cosecha, para esto su primera opción es quemarlos (Yadvinder-Singh et al., 2005). Una opción más económica en términos generales. Sin embargo, genera a corto plazo problemas de salud humana y animal (Gadde et al., 2009), y a largo plazo problemas en la salud del suelo y el ambiente (Gupta et al., 2004), de esta manera provoca cambios drásticos e irreparables en el agroecosistema (Dobermann & Fairhurst, 2002).

Su segunda opción, es la incorporación de los residuos al suelo, ya sea realizado inmediatamente o después de algunos días o incluso hasta un mes, con el fin de facilitar la degradación, de igual forma, también se pueden aplicar microorganismos o consorcios microbianos que faciliten dicho proceso. Esta opción es económicamente más costosa

debido al tiempo que se debe esperar para la degradación, así como al empleo de la maquinaria para particular el tamo, aplicar los microorganismos y posteriormente realizar la incorporación. Adicionalmente ya sea dejando el tamo como cobertura o incorporado inmediatamente, existe el riesgo de introducción de fitopatógenos del cultivo anterior. Sin embargo, y aunque sus resultados son tangibles muchos años después, ya que se alcanza de manera acumulativa, esta opción es mucho más amigable con el ambiente y permite la conservación de los agroecosistemas.

En este contexto, el cultivo de arroz provee un agroecosistema particular que permite estudiar el efecto de las diferentes estrategias de manejo del TA como son la quema, la cobertura y la incorporación del TA con y sin microorganismos que faciliten su degradación, sobre las variables asociadas a la productividad del cultivo y la transmisión de enfermedades. Este tipo de estudio podría ilustrar la dinámica de las comunidades microbianas tanto a nivel de composición (diversidad microbiana), estructura (composición y abundancia) y función (identificación y detección de genes y actividades enzimáticas) (**Figura 1-1**), lo cual es de vital importancia para identificar las condiciones de manejo que favorecen la consolidación de una comunidad microbiana en el suelo de soporte y la rizósfera, encargada entre otras del proceso de degradación de este material vegetal en el suelo más saludable desde el punto de vista funcional para el cultivo de arroz.

## **1.4 Preguntas de investigación**

- ¿Cuál es el efecto de cuatro diferentes manejos del tamo de arroz sobre la estructura y función de las comunidades microbianas?
- ¿Los diferentes manejos de tamo afectan las funciones relacionadas con los ciclos de carbono, nitrógeno y fósforo?
- ¿Cómo las diversas estrategias de manejo del TA, afectan los parámetros agronómicos y fitosanitarios del cultivo?

## **1.5 Hipótesis**

- La incorporación de una enmienda de carbono sobre un cultivo comercial de arroz, afectará la estructura y función de la comunidad microbiana del suelo.

- La aplicación de enmiendas de carbono en un cultivo comercial de arroz, modifica la función de la comunidad microbiana relacionadas al ciclaje de nutrientes de carbono, nitrógeno y fósforo.
- Diferentes enmiendas de carbono afectan tanto la producción como el estado fitosanitario en un cultivo comercial de arroz.

## 1.6 Objetivo general

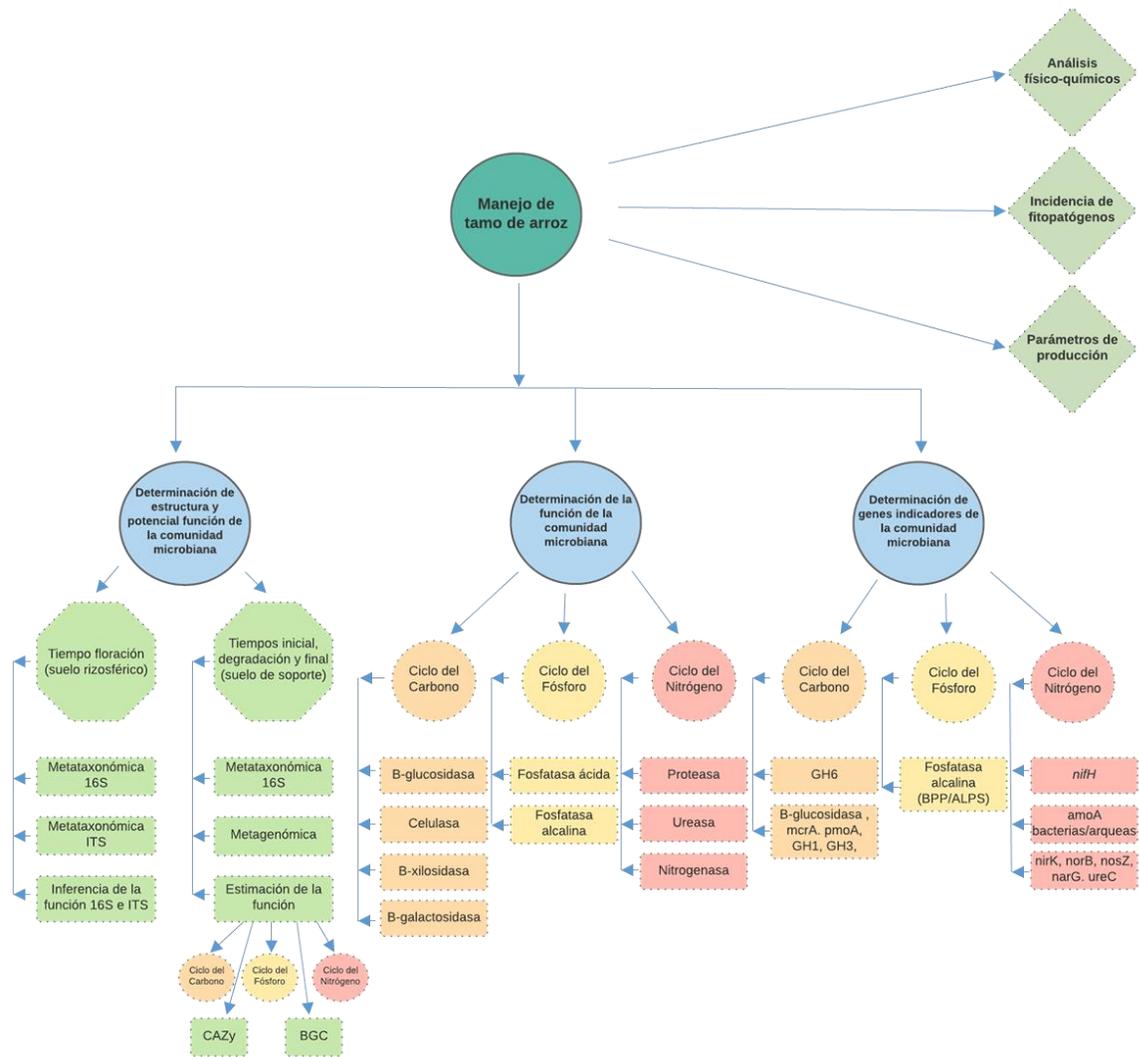
Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura y función de las comunidades microbianas asociadas a los ciclos biogeoquímicos de C, N y P y sobre la productividad de un cultivo de arroz.

## 1.7 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz.
- Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la actividad enzimática asociada a algunas funciones del ciclo de C, N y P en cultivos de arroz.
- Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos del C, N y P, en un cultivo comercial de arroz.

## 1.8 Esquema de la tesis

Figura 1-1: Representación esquemática del proceso de desarrollo de la tesis.



Nombre de la fuente: Elaboración propia

## 2. Metodología

### 2.1 Área de estudio

El área experimental fue establecida en el centro experimental Las Lagunas (3°54'56.4N, 74°58'57E) de la Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz) en Saldaña - Tolima, Colombia. La estación experimental está localizada en un clima tropical, con una precipitación anual de 210 mm y una temperatura promedio de 28°C. El área experimental tiene un suelo franco-arcilloso, con un pH = 5.24 y un contenido de N = 0.1%; CO = 0.4%; P = 40.3 mg·kg<sup>-1</sup>; Ca = 4.8 meq·100g<sup>-1</sup>; Mg = 0.8 meq·100g<sup>-1</sup>; Na = 0.3 meq·100g<sup>-1</sup>, y Al = 0.4 meq·100g<sup>-1</sup>.

### 2.2 Material biológico

La variedad de arroz empleada en este estudio fue FL-Fedearroz 68, el cual es tolerante a *Pyricularia grisea*, pero susceptible a *Rhizoctonia solani*. FL-Fedearroz 68 tiene un ciclo vegetativo de 105 días, 20 días menos que la mayoría de las variedades comerciales, adicionalmente presenta un alto potencial de rendimiento (13 ton·ha<sup>-1</sup>) (Hernández León, 2016).

Los microorganismos (MOs) aplicados al TA fueron previamente seleccionados en un trabajo del grupo de investigación (Cruz-Ramírez et al., 2017). Los MOs aplicados en dos de los cuatro tratamientos fueron: *Bacillus pumilus* IBUN 02717, obtenido de la colección de cepas y genes del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia y un consorcio comercial de *Trichoderma* (Fitotripen®) suministrado por la empresa Natural Control Ltda. (La Ceja - Antioquia, Colombia). Para la preparación de la suspensión bacteriana, el *Bacillus pumilus* IBUN 02717 fue sembrado en medio de esporulación (Abarca et al., 1992) a 28°C con 175 rpm durante 10 días. Cumplido el tiempo, la biomasa fue lavada tres veces con solución salina estéril (NaCl 0.85%) (SSE) por centrifugación durante 10 min a 7258 g a temperatura ambiente. La biomasa finalmente

fue resuspendida en 200 mL de SSE, su concentración fue estimada por la técnica de microgota en agar LB. La suspensión fue conservada a 4°C hasta su aplicación en campo. El inóculo fúngico se preparó mediante dilución del polvo comercial en SSE hasta alcanzar la concentración necesaria. Finalmente se aplicó dos litros de la suspensión bacteriana a una concentración de  $1.7 \times 10^7$  de esporas bacterianas  $\cdot \text{mL}^{-1}$  y  $1.0 \times 10^6$  conidios fúngicos  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , mediante bomba manual de pulverización.

## 2.3 Ensayo de campo

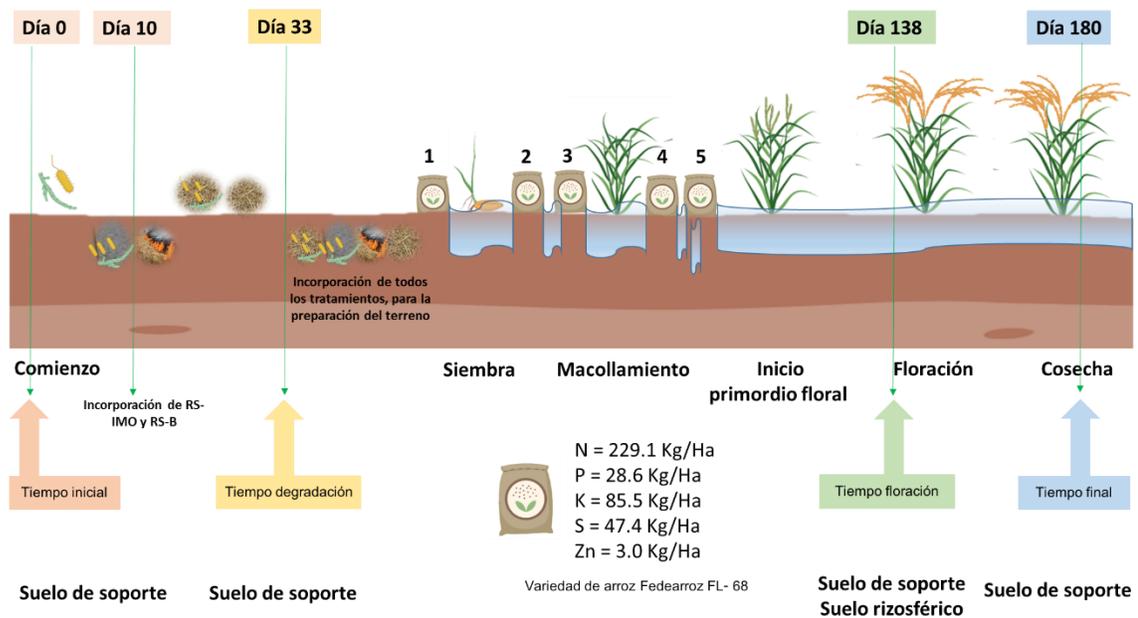
En campo, se realizó un diseño de bloques incompletos al azar, con el fin de evaluar el efecto de cuatro diferentes tratamientos para el manejo del TA, bajo un sistema estándar de cultivo de arroz sumergido. En este sistema para la aplicación de fertilizantes se realiza un drenaje del agua la cual es posteriormente reestablecida ([Figura 2-1](#)). La composición del TA fue de 4.4% de proteína cruda, 9.3% de lignina, 43.8% de celulosa y 19.4% de hemicelulosa. Los tratamientos evaluados fueron:

- a. **Incorporación MO (RS-IMO):** Este tratamiento consistió en aplicar dos litros del inóculo microbiano (MO) al TA a la concentración mencionada anteriormente, incorporarlo al suelo mediante tractor con discos de rastra y dejarlo incorporado previo a la preparación del terreno para la siembra por un periodo de 22 días, el cual fue llevado a cabo a los 11 días de haber aplicado los microorganismos sobre el tamo de arroz.
- b. **Cobertura MO (RS-MMO):** En este tratamiento se aplicó dos litros de inóculo microbiano en las mismas condiciones que el tratamiento anterior. Sin embargo, el TA fue dejado como cobertura en el suelo hasta la preparación del siguiente ciclo de cultivo, por un periodo de 33 días.
- c. **Cobertura (RS-M):** En este tratamiento no se aplicó inóculo microbiano al TA, que fue dejado en el suelo hasta la preparación para el siguiente ciclo de cultivo (33 días).
- d. **Quema (RS-B):** Este tratamiento es la estrategia tradicional de manejo del TA en campo por los agricultores. Consistió en quemar el TA *in situ* con posterior incorporación de las cenizas y el material vegetal restante (tamo quemado y raíces) en el suelo mediante tractor con discos de rastra, hasta la preparación del siguiente

ciclo de cultivo por un periodo de 22 días, el cual fue llevado a cabo a los 11 días de haber aplicado los microorganismos sobre el tamo de arroz.

El diseño experimental incluyó cuatro réplicas por tratamiento, cada parcela de un tamaño de 33.75 m<sup>2</sup>. Las muestras fueron colectadas durante el período de lluvias de 2016 y se dividieron en tiempo inicial (10/04), tiempo de degradación (13/05; 33 días después de inicio del ensayo), tiempo de floración de las panículas de arroz (26/08; 138 días después del inicio del ensayo) y tiempo final (05/10; 180 días después del inicio del ensayo) (Figura 2-1). Todos los tratamientos fueron fertilizados según las recomendaciones de Fedearroz para el campo experimental como sigue: 229.1 kg N·ha<sup>-1</sup>, 28.6 kg P·ha<sup>-1</sup>, 85.5 kg K·ha<sup>-1</sup>, 47.4 kg S·ha<sup>-1</sup> y 3.0 kg Zn·ha<sup>-1</sup>.

**Figura 2-1:** Representación esquemática de los procedimientos de manejo agrícola y períodos de muestreo realizados en el desarrollo del ensayo en campo.



Nombre de la fuente: Elaboración propia

## **2.4 Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo de arroz**

Al momento de la cosecha se determinó la altura de la planta (cm), mediante la selección de diez plantas de arroz de manera aleatoria a partir de cada una de las parcelas experimentales. Adicionalmente, se llevó a cabo la demarcación y corte de las espigas contenidas en un área correspondiente a 4 m<sup>2</sup> con el objeto de estimar el rendimiento del grano (ton·ha<sup>-1</sup>), para la determinación del rendimiento se empleó un factor de corrección para ajustar las mediciones al 14% de humedad, mediante la detección de la humedad inicial de los granos colectados a través de un higrómetro (Moisture Meter Charts, modelo 919®).

La evaluación del número de panículas y la calidad de los granos producidos se determinó mediante el empleo de un marco de 0.25 m<sup>2</sup> que fue lanzado una vez hacia el centro de cada parcela. Las panículas contenidas en dicha área fueron cortadas y contadas al igual que los granos cosechados, de esta manera se determinó el número de panículas, peso de 1000 granos (gr) y el porcentaje de vaneamiento (%), siguiendo la metodología de (Marentes et al., 2011).

La determinación del estado fitosanitario del cultivo fue efectuada con la asesoría del técnico Arcadio Mora encargado de realizar las valoraciones del estado fitosanitario en Fedearroz, estación Las Lagunas, de Saldaña Tolima. En este contexto para cada una de las parcelas del estudio se realizó una evaluación visual del porcentaje de incidencia de los siguientes fitopatógenos: *Helminthosporium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Pyricularia sp.*, *Gaeumannomyces sp.*, y *Burkholderia glumae*, hacia el final del ciclo del cultivo alrededor de una semana antes de la cosecha.

## **2.5 Análisis físico-químicos**

El análisis físico-químico del suelo de soporte se realizó al inicio y al final del cultivo siguiendo los protocolos estándar del laboratorio de análisis de aguas y suelos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Nacional de Colombia. El pH fue determinado por potenciometría en agua; el Ca, K, Mg y Na fueron extraídos con acetato de amonio y medido por absorción atómica; el Al fue extraído con KCL y titulado volumétricamente; la capacidad de intercambio catiónico efectiva (ECEC, por sus siglas en

inglés) fue estimada por la suma de los cationes intercambiables; el carbono orgánico fue determinado por el método Walkley-Black; el N total fue determinado por el método de Kjeldahl; el P total por el método de Bray II y la textura por el método de Bouyucos (Pansu & Gautheyrou, 2006).

## **2.6 Colección de muestras de suelo de soporte y suelo rizosférico**

Las muestras de suelo de soporte fueron colectadas a partir de la capa orgánica (0 -10 cm) de cada una de las parcelas, se tomó cinco (5) núcleos de suelo (3 cm de diámetro, 10 cm de profundidad) separados y distribuidos aleatoriamente en la misma parcela. Los núcleos colectados fueron almacenados en una bolsa estéril plástica sellada y transportada en cadena de frío hasta el laboratorio de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, donde posteriormente se realizó una limpieza de manera manual para remoción de las raíces y detritos visibles con posterior mezcla de manera proporcional para cada una de las parcelas. Este procedimiento se realizó para cada uno de los tiempos.

Para el muestreo de suelo rizosférico, cinco plantas por parcela fueron removidas de cinco puntos diferentes separados de manera equidistante entre ellos. Cada planta fue sacudida manualmente para remover los agregados del suelo y el suelo que permaneció fuertemente unido a la raíz, fue considerado suelo rizosférico. Posteriormente este suelo se procesó mediante el protocolo propuesto por Lundberg et al., (2012) con algunas modificaciones. Brevemente, diez gramos (10 g) de peso fresco de raíz con suelo rizosférico adherido fue colocado en tubos de centrifuga 50 mL, sumergido en 30 mL de buffer fosfato 1X - Tween 20® 2% (v/v) y agitado durante 10 min en un shaker Multi-wrist®, para una posterior centrifugación por cinco minutos (5 min) a 7258g. El suelo colectado en el fondo del tubo fue conservado para un segundo ciclo de lavado, posteriormente fue colectado y procesado inmediatamente para la extracción de DNA.

## **2.7 Objetivo 1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función potencial de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz**

### **2.7.1 Extracción de DNA, amplificación del gen 16S e ITS y secuenciación**

El DNA total fue extraído a partir de 250 mg de suelo, empleando el MoBio PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de verificar la pureza del DNA extraído se realizó una electroforesis, y posterior cuantificación en Nanodrop (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para verificar la calidad y determinar la concentración del DNA extraído.

El gen 16S rRNA fue amplificado con los cebadores universales 341F - 805R (Sinclair et al., 2015) que amplifican la región V3-V4 de bacterias y arqueas. En el caso de los hongos, las regiones ITS (ITS1 e ITS2), fueron amplificadas empleando los cebadores ITS1F-ITS4R (Grum-Grzhimaylo et al., 2016) que amplifica la región ITS1 e ITS2. Las librerías fueron construidas siguiendo los protocolos de Illumina Paired-End Metagenomic Prep Kit (2x300 pb). La secuenciación se realizó en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison, empleando la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego CA) con finales pareados de 2x300 pb.

En el caso de la metagenómica shotgun, se empleó la plataforma Illumina HiSeq 2000, finales pareados de 2x150 pb. El envío de las muestras se llevó a cabo bajo permiso de acceso a recurso genético No 01023 emitido por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA).

### **2.7.2 Procesamiento de secuencias 16S rRNA e ITS en tiempo de floración**

Los datos crudos de las secuencias de 16S rRNA para el tiempo de floración fueron procesados en QIIME2 v 2019.7 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). El proceso de *denoising*, dereplicación y filtrado de quimeras fue realizado con el método consenso

aplicado a través de DADA2 (Callahan et al., 2016). Luego de verificar los formatos de calidad de las secuencias (fastqc), las secuencias en el sentido 5' -- 3' fueron truncadas en la posición 271 pb, es decir se removieron los nucleótidos desde esta posición en adelante en todas las secuencias. De igual manera fueron removidas las primeras 10 pb en el extremo 3' de dichas secuencias; adicionalmente, se eliminaron las secuencias que no cumplieron con un Phred score de 20 (Q20). Los *singletons* fueron descartados como parte del procesamiento de datos dentro de DADA2. Finalmente, se decidió trabajar únicamente con las secuencias sentido 5' -- 3", debido a que, una vez realizada la limpieza de las secuencias de ambos extremos, estas no se superlapan.

La asignación taxonómica con un 97% de identidad de las variantes de secuencias de los amplicones (ASV por sus siglas en inglés), fue realizado usando el complemento *fit-classifier-naïve-bayes* (Pedregosa et al., 2015), contra la base de datos de referencia SILVA 132 (Quast et al., 2013). Posteriormente para el análisis de los tratamientos, solo los ASVs presentes mínimo en dos réplicas de un tratamiento fueron empleados. La predicción funcional de las secuencias de bacterias y arqueas fue realizada mediante PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States), soportada por GitHub (<https://github.com/picrust/picrust2/wiki>) basada en familia de genes y genomas de referencia (Douglas et al., 2019).

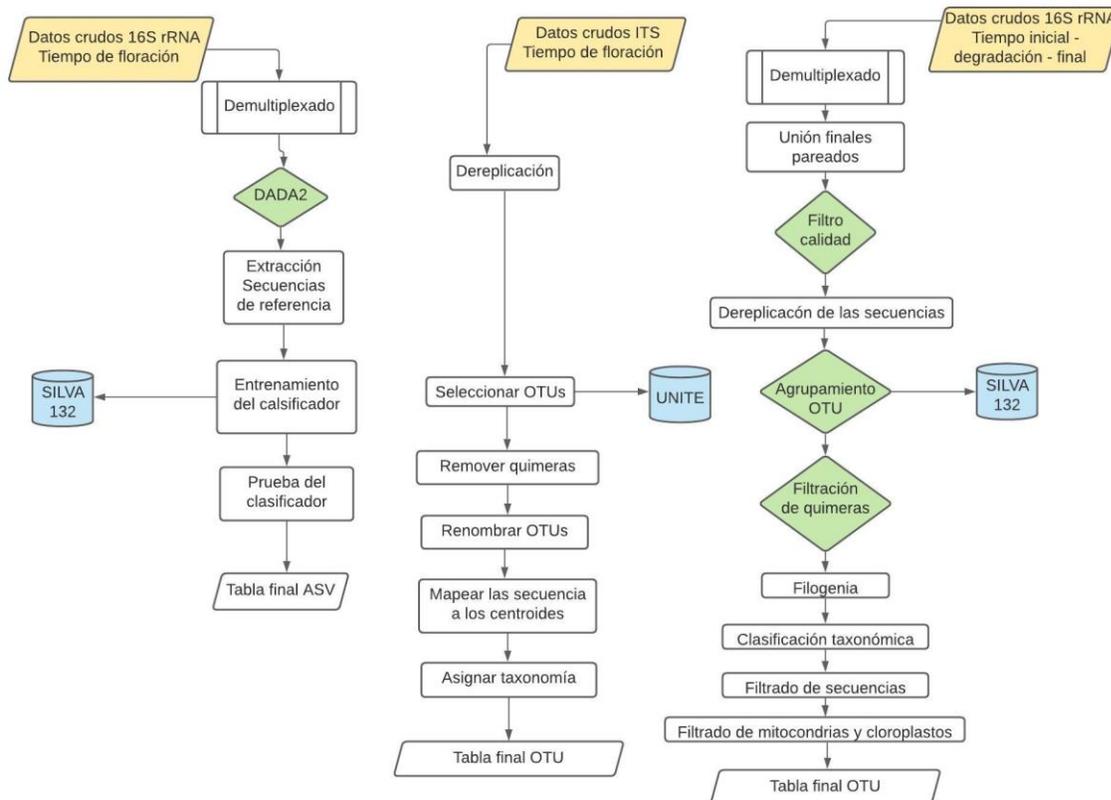
La predicción funcional de las secuencias de hongos fue realizada a través del procesamiento de las secuencias de los ITS en PIPITS (Gweon et al., 2015). La alta variabilidad de la longitud de las secuencias ITS1 e ITS2 impide el ensamblaje pareado, por lo tanto, solo las secuencias ITS1 (sentido 5' – 3') fueron empleadas para el análisis. Las secuencias seleccionadas fueron aquellas que tuvieron un mínimo Phred score de 20 (Q20).

Se extrajo la región ITS y posteriormente, se realizó la dereplicación con el fin de remover las secuencias redundantes y secuencias únicas menores de 100 pb; la detección y remoción de quimeras fue realizada empleando UNITE v7.2 (Abarenkov et al., 2010), y el set de datos de referencia de UCHIME (Edgar et al., 2011). Finalmente, PIPITS emplea VSEARCH (Rognes et al., 2016) para el agrupamiento de secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs por sus siglas en inglés) a un 97% de identidad, y escoge la secuencia representativa de cada grupo para la asignación taxonómica

### 34 Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz

empleando RDP Classifier (Wang et al., 2007), contra la base de datos de referencia UNITE v7.2. La predicción funcional de las secuencias de hongos fue empleada con el fin de asignar funciones ecológicas o modos tróficos (patótrofo, simbiótrofo, saprótrofo) de los diferentes hongos encontrados en el estudio mediante el empleo de la base de datos FunGuild v1.1.py soportada por GitHub (<https://github.com/UMNFuN/FUNGuild>; Nguyen et al., 2016) (Figura 2-2). Las secuencias crudas se encuentran depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el Bioproject PRJNA528984, con los números de accesión SRR8785128 a SRR8785139 para las secuencias del gen 16S rRNA, y SRR8785186 a SRR8785197 para las secuencias de las regiones ITS.

**Figura 2-2:** Diagrama de flujo de procesamiento de secuencias de 16S rRNA y de secuencias de ITS provenientes de tiempo de floración de suelo rizosférico y de secuencias de 16S rRNA de tiempo inicial, degradación y final provenientes de suelo de soporte.



Nombre de la fuente: Elaboración propia

### 2.7.3 Procesamiento de secuencias 16s rRNA en los tiempos inicial, degradación y final

Los datos crudos de las secuencias de 16S rRNA para el tiempo inicial, degradación y final, previamente analizados por (Carreño-Carreño, 2019), fueron nuevamente procesados en QIIME2 v 2019.7. Inicialmente se unieron las secuencias pareadas y se seleccionaron aquellas con una longitud mínima de 400 pb, posteriormente se realizó la remoción de los adaptadores y un primer filtro de calidad con un mínimo Phred score de 20 (Q20); en el siguiente paso se realizó la dereplicación y el agrupamiento en OTUs mediante la estrategia *open reference* a través de VSEARCH contra la base de datos SILVA 132 (Quast et al., 2013).

En los pasos subsiguientes se realizó la eliminación de las quimeras por el método de *novo*, excluyendo incluso las quimeras *borderline*; la asignación taxonómica se realizó con la base de datos de referencia SILVA 132 a un 97% de identidad; mientras que la filogenia fue obtenida mediante el complemento *align-to-tree-mafft-fasttree* en QIIME2 v 2019.7. Una vez obtenida la tabla de conteos, se aplicó un filtro para eliminar toda secuencia que no estuviese presente en mínimo dos de las tres réplicas; adicionalmente se eliminaron las secuencias que presentaron coincidencias con mitocondrias y cloroplastos (Figura 2-2).

Las secuencias crudas se encuentran depositadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo el Bioproject PRJNA528984, con los números de accesión SRR1281712 a SRR12811709.

### 2.7.4 Procesamiento de secuencias obtenidas por metagenómica (shotgun)

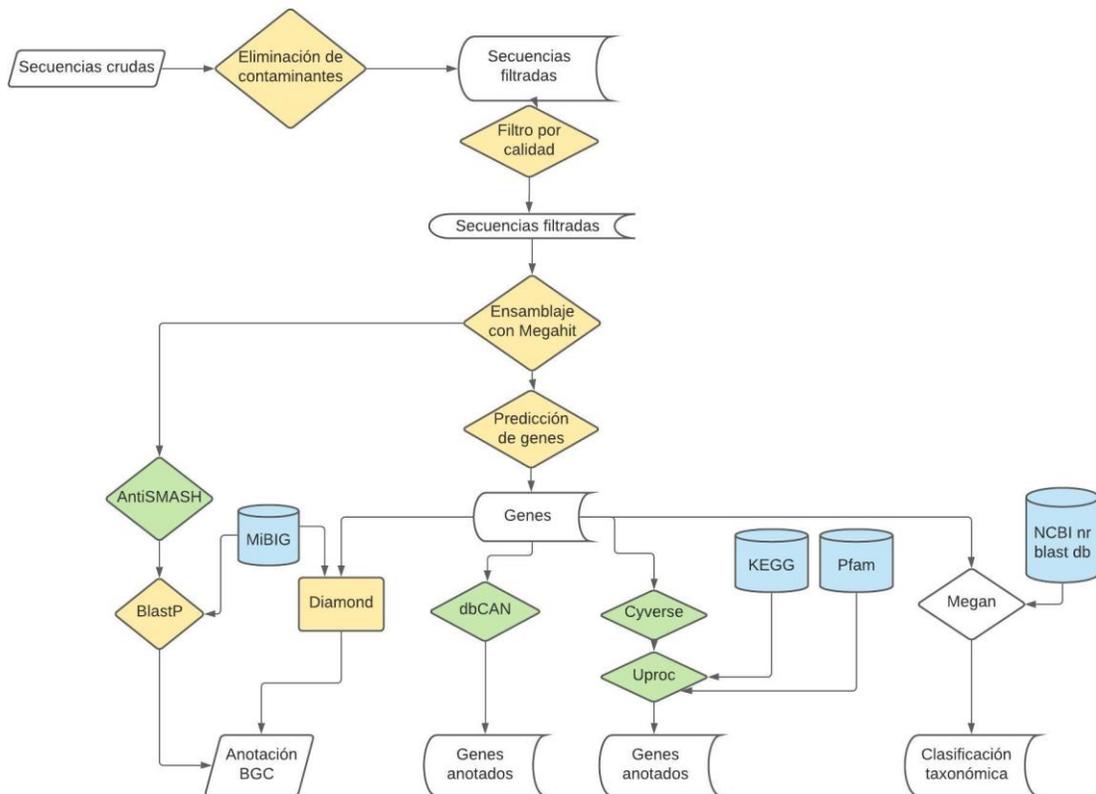
Las secuencias crudas fueron mapeadas contra la secuencia del genoma de la planta huésped (*Oryza sativa*) con el fin de eliminar secuencias contaminantes. Se empleó Sickle (<https://github.com/najoshi/sickle>), con el fin de mantener un Phred score mínimo de 30 (para tener una mejor calidad de las secuencias al tener una llamada incorrecta de las bases por cada 1000 bases, 1:1000) y una longitud mínima de 75 pb, de esta manera quedaron solo secuencias de alta calidad. El ensamblaje de las secuencias se realizó a través de Mehagit v.1.2.9 (Li et al. 2015) se realizó una comparación entre los parámetros

meta (genéricos para metagenomas), meta-sensitive (más sensible), meta-large (para metagenomas largos y complejos), finalmente la longitud de los k-mers seleccionados fueron los que presentaron mejor resultados, es decir k-mers con longitud 31, 51, 71, 91, 99, 117.

Los *contigs* resultantes fueron empleados para la predicción de genes a través de Prodigal v.2.6.3 (Hyatt et al., 2010) y FragGeneScan v.1.31 (Rho et al., 2010). Los genes resultantes fueron asignados a la taxonomía, a través de Diamond contra la base de datos no redundante Blast del NCBI de Julio-2019. La más baja clasificación del ancestro común fue determinada usando MEGAN v.6.18.0 (Huson et al., 2007). Todos los *contigs* fueron procesados con antiSMASH v.5.0 (Blin et al., 2019; Medema et al., 2011) con los parámetros por defecto, con el fin de identificar grupos de genes biosintéticos (BGCs por sus siglas en inglés).

Posterior de la predicción de genes, se realizó la anotación empleando dbCAN (Huang et al., 2018; Yin et al., 2012; H. Zhang et al., 2018) con el fin de anotar enzimas activas sobre carbohidratos (CAZyme), responsables de la síntesis, degradación y modificación de todos los carbohidratos. La anotación funcional fue realizada empleando UProc para anotar genes con la base de datos de KEGG y Pfam mediante la plataforma Cyverse (<https://de.cyverse.org/de/>) (Figura 2-3).

**Figura 2-3:** Diagrama de flujo de procesamiento de datos metagenómicos siguiendo el protocolo propuesto por Carrión et al., (2019) con las modificaciones mencionadas en el texto y que se visualizan en este diagrama.



Nombre de la fuente: Elaboración propia. Modificado de Carrión et al., (2019)

## 2.8 Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la actividad enzimática asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz

### 2.8.1 Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo de carbono

La actividad celulasa (EC 3.2.1.4), se determinó mediante el método propuesto por (Schinner & Mersi, 1990), el cual permite la determinación de azúcares reductores generados posterior a la incubación de la muestra de suelo (5 g) con carboximetil celulosa (CMC) 0.7% en buffer acetato (pH 5.5) por 24 h a 50°C. Este método estima la actividad endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de azúcares reductores producidos en 24 h por gramo de suelo seco ( $\mu\text{g}$  de azúcares reductores  $\text{gss}^{-1}\cdot 24\text{h}^{-1}$ ). Todas las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado contra cuatro controles.

Por su parte la actividad  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) fue estimada por el método propuesto por Eivazi & Tabatabai (1988), con algunas modificaciones. Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de *p*-nitrofenol liberado luego de 1 h de incubación de las muestras de suelo con el sustrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido - (pNPG). Brevemente 200 mg de suelo fueron incubados con sustrato (pPNG 25mM) a pH 6.0 y 37°C, después de 1 h se adicionó CaCl<sub>2</sub> 0.5 M y el buffer universal modificado pH 12.0, se mezcló por medio de un vortex y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm a 4°C, el sobrenadante fue diluido 1:4 y la cantidad de *p*-nitrofenol liberado por la enzima fue colorimétricamente determinado a 400 nm en un lector de microplacas de 96 pozos Multi-Scan™ FC (Thermo Fisher Scientific - USA). La actividad de la enzima fue expresada como  $\mu\text{g}$  de producto por gramo de suelo seco por hora ( $\mu\text{g}$  de pNPG $\cdot\text{gss}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

La actividad  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) y  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23), se desarrollaron de acuerdo a los protocolos propuestos por Eivazi & Tabatabai (1988) con ligeras modificaciones. El procedimiento fue el mismo que para la actividad  $\beta$ -glucosidasa, donde se cambió el sustrato a *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosido (pPNPX) para determinación de  $\beta$ -xilosidasa y a *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (pPNPGa) para la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La actividad de la enzima fue expresada como  $\mu\text{g}$  de producto por gramo de suelo seco por hora ( $\mu\text{g}$  de pNPX $\cdot\text{gss}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  y  $\mu\text{g}$  de pPNPGa $\cdot\text{gss}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Estas actividades fueron reportadas en la tesis de pregrado "*Efecto del manejo del tamo de arroz sobre la abundancia de microorganismos totales, celuloíticos y ligninolíticos cultivables y actividades enzimáticas asociadas al ciclo del carbono*" desarrollada por (Murillo-Antolinez, 2018).

### **2.8.2 Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del fósforo**

La determinación de las actividades fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) y fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) se realizó mediante el método propuesto por Eivazi & Tabatabai (1977) y Tabatabai & Bremner (1969) basado en la determinación de *p*-nitrofenol liberado luego de la incubación de una suspensión proveniente de una dilución de los suelos analizados con *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) como sustrato por un período de 1 h a 37°C.

Brevemente 200 mg de suelo fueron incubados con sustrato (pNPP 15mM) y Buffer Universal Modificado (MUB) a pH 6.5 ajustado con HCL 0.1 M o pH 11 ajustado con NaOH 0.1M (dependiendo si la determinación es para fosfatasa ácida o alcalina respectivamente) y 37°C, después de 1 h se adicionó CaCl<sub>2</sub> 0.5 M y NaOH 0.5 M, se mezcló en un vortex y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm a 4°C, el sobrenadante fue diluido 1:9 y la cantidad de *p*-nitrofenol liberado por la enzima fue colorimétricamente determinado a 400 nm en un lector de microplacas de 96 pozos Multi-Scan™ FC (Thermo Fisher Scientific - USA). La actividad de la enzima fue expresada como µg de producto por gramo de suelo seco por hora (µg pNPP·gss<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>).

### 2.8.3 Actividades enzimáticas relacionadas con el ciclo del nitrógeno

La actividad proteasa (EC 3.4.21.112) se determinó de acuerdo al protocolo propuesto por Ladd & Butler (1972), esta prueba se basa en la determinación de aminoácidos liberados posterior a la incubación de 0.1g de suelo con buffer Tris (50mM) a pH 8.1 donde el caseinato de sodio se empleó como sustrato. La mezcla fue incubada por dos horas a 50°C. La reacción se detuvo por la aplicación de ácido tricloroacético (15%) y posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se mezcló con el reactivo de Folin-Ciocalteus en solución alcalina y determinado fotométricamente a 700 nm. La actividad enzimática se reporta como miligramos de tirosina por gramo de suelo seco por dos horas (mg tirosina·gss<sup>-1</sup>·2h<sup>-1</sup>).

La actividad ureasa (EC 3.5.1.5) por su parte, se determinó de acuerdo al protocolo propuesto por Kandeler & Gerber (1988), mediante el cual se cuantifica colorimétricamente el amonio liberado posterior a la incubación de 250 mg de suelo con buffer borato a pH10 y urea al 20% como sustrato. La mezcla se incuba a 37°C por dos horas momento en el cual se detiene la reacción con KCl 1N y se lee a 690nm. Esta actividad se reporta como microgramos (µg) de Nitrógeno proveniente del amonio por gramo de suelos seco por dos horas (µg NH<sub>4</sub>-N·gss<sup>-1</sup>·2h<sup>-1</sup>).

Finalmente, la nitrogenasa (EC 1.18.6.1), fue determinada por el método de reducción de acetileno según lo propuesto por Limmer & Drake (1996) con leves modificaciones a saber, se adicionó una solución de glucosa/manitol (10g/L) a las muestras de suelo en un frasco ámbar, a la cual se le retira el 20% v/v de atmósfera y se reemplaza con acetileno, se

incuba a 32°C por tres días. La medición se realiza luego de inyectar 1 mL de la atmósfera del frasco en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014 con el fin de detectar la concentración de etileno generado a consecuencia de la actividad de reducción de acetileno. Tanto el acetileno como el etileno pueden ser identificados mediante cromatografía de gases empleando para ello nitrógeno como gas de arrastre. Finalmente, la cantidad de etileno generado se calcula mediante la comparación frente una curva estándar de calibración. Los resultados se expresan en nanogramos (ng) de etileno producidas por gramo de suelo seco por hora ( $\text{ng}\cdot\text{gss}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

La actividad proteasa (EC 3.4.21.112), ureasa (EC 3.5.1.5) y nitrogenasa (EC 1.18.6.1), fueron reportadas en la tesis de maestría *“Evaluación de diversidad taxonómica y funcional de microorganismos relacionados con el ciclo de nitrógeno en suelos de cultivo de arroz con diferentes manejos del tamo”* desarrollada por Carreño-Carreño (2019).

## **2.9 Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz**

### **2.9.1 Selección de genes indicadores y diseño y evaluación de cebadores**

Para los ciclos biogeoquímicos de C, N y P, se revisó en literatura secuencias de cebadores previamente reportadas que identificaran procesos de interés en el estudio. Así para el ciclo de carbono entre los procesos de interés tenemos: 1. Metanogénesis (gen metil coenzima-M reductasa - *mcrA*); 2. Metanotrofia (gen metano monooxigenasa particulado - *pmoA*), 3. Degradación de carbono (gen que codifica para la familia glicosil hidrolasa 1 – GH1 -  $\beta$ -glucosidasa – *Cel*; gen que codifica para la familia glicosil hidrolasa 3 - GH3 –  $\beta$ -glucosidasa/xylan 1,4 –  $\beta$  xilosidasa; gen que codifica para la familia glicosil hidrolasa 6 - GH6 - Celobiohidrolasa II – endoglucanasa y celobiohidrolasa).

Debido a que en el momento de la revisión bibliográfica no se encontró reporte de cebadores para el gen de la  $\beta$ -glucosidasa, se procedió al diseño de cebadores por medio

de la herramienta j-CODEHOP (Boyce et al., 2009). Brevemente, en la base de datos del NCBI, se seleccionó cada una de las diferentes secuencias de proteínas identificadas como  $\beta$ -glucosidasa, posteriormente se verificó la secuencia en la base de datos de proteínas Pfam, que perteneciera a la GH1 o GH5. Una vez confirmadas se realizó la selección de secuencias bacterianas y un posterior alineamiento en Bioedit, donde se obtuvo la secuencia consenso. Esta secuencia fue introducida en j-CODEHOP que arrojó ocho posibles parejas de cebadores, de donde se seleccionó una pareja por su capacidad de reconocimiento de los motivos de proteínas de interés.

En cuanto al ciclo de fósforo el interés se enfocó en procesos como: 1. Mineralización (gen fitasa de hélice  $\beta$  - *BPP*) y (gen fosfatasa alcalina – *ALPS*). Mientras que, para el ciclo de nitrógeno, los procesos de interés fueron: 1. Fijación de nitrógeno (gen nitrogenasa - *nifH*); 2. Nitrificación (gen amonio monooxigenasa - *amoA* de bacterias y arqueas); 3. Desnitrificación (gen nitrito reductasa – *nirK*; gen óxido nitroso reductasa – *nosZ*; gen óxido nítrico reductasa – *norB*; gen nitrato reductasa - *narG*); 4. Mineralización (gen *ureC*).

Una vez seleccionados todos los cebadores para los procesos de interés, se probó tanto las concentraciones de los reactivos, así como el perfil de ciclos térmicos para el desarrollo de las PCR convencional. En la [tabla 2-1](#), se señalan los cebadores que finalmente generaron resultado, la lista completa de cebadores estudiados se encuentra en el [anexo B](#).

**Tabla 2-1:** Listado de cebadores y condiciones de ciclos térmicos empleados en PCR convencional para la amplificación de los genes de interés

Gen	Cebador (5' – 3')	Tamaño de la amplificación (pb)	Fuente de calibración	Perfil de los ciclos térmicos en PCR convencional	Referencia
<b><i>amoA</i></b>	<b>amoA-1F</b> (GGGGTTTC TACTGGTG GT) <b>amoA2R</b> (CCCCTCKG SAAAGCCT TCTTC)	490 bp	Clon de suelo	95°C x 10 min, 1 ciclo 94°C x 1 min, 60°C x 1 min, 72°C x 1 min, 40 ciclos 72°C x 7 min	(Le Roux et al., 2008)

42 **Determinación del efecto del manejo del tamo de arroz sobre la estructura y función de la comunidad microbiana en suelos de cultivo de arroz**

<b>amoA.A</b>	<b>Arch-amoAF</b> (STAATGGT CTGGCTTA GACG) <b>Arc-amoA2R</b> (GCGGCCA TCCATCTGT ATGT)	624 bp	Clon de suelo	95°C x 10 min, 1 ciclo 94°C x 40 seg, 56°C x 30 seg, 72°C x 1 min, 40 ciclos 72°C x 5 min	(Le Roux et al., 2008)
<b>nifH</b>	<b>FGPH19</b> (TACGGCAA RGGTGGNA THG) <b>PoIR</b> (ATSGCCAT CATYTCRC CGGA)	452 bp	Clon de suelo	95°C x 10 min, 1 ciclo 94°C x 1 min, 55°C x 27 seg, 72°C x 1 min, 40 ciclos 72°C x 5 min	(Poly et al., 2001; Simonet et al., 1991)
<b>GH 6</b>	Cel2F (ACCTGCCC GRCCGYGA CT) Cel 2R (GAGSGART CSGGCTCR AT)	150 bp	Clon de suelo	95°C x 10 min, 1 ciclo 95°C x 40 seg, 64°C x 45 seg, 72°C x 30 seg, 40 ciclos 72°C x 5 min	(Merlin et al., 2014)

### 2.9.2 Elaboración de curva estándar para la cuantificación de secuencias a través de PCR en tiempo real

A partir de células químicamente competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  conservadas por máximo un mes a -80°C, se realizó la clonación y transformación con los genes seleccionados, empleando el kit TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Fueron seleccionadas las colonias blancas en agar LB suplementado con ampicilina y kanamicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada antibiótico), X- GAL (40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e IPTG (100 mM), incubadas por 24 h a 37°C. Posteriormente la selección de las transformantes fue realizada mediante amplificación con los cebadores M13F/M13R para verificar la inserción del fragmento de interés. Finalmente, se realizó la extracción del plásmido con el kit PureLink® Quick Plasmid DNA Miniprep Kits, siguiendo las instrucciones del fabricante, y finalmente el plásmido fue suspendido en agua.

El tamaño del plásmido que ya incluía el inserto fue confirmado en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR™ Safe™ de Invitrogen™. El plásmido fue secuenciado en el Instituto de

Genética de la Universidad Nacional de Colombia (IGUN) con el fin de confirmar la identidad del gen clonado a partir de suelo. Las secuencias de los clones obtenidos se analizaron en un alineamiento local contra la base de datos de secuencia de nucleótidos y proteínas del GenBank del NCBI empleando BLASTn y BLASTx, de esta manera se confirmó que el fragmento clonado correspondía al gen de interés. La cuantificación de la concentración del ADN plasmídico fue realizada por fluorimetría con el kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay en el equipo Qubit® de Invitrogen y por espectrofotometría en NanoDrop One®. Con este dato se calculó el número de copias mediante la fórmula:

$$\frac{([\text{nanogramos del constructo}] \times (6.022 \times 10^{23}))}{(\text{Tamaño en pares de bases del constructo}) \times (1 \times 10^9) \times 650}$$

Una vez determinado el número de copias se generó una curva estándar con una serie de diluciones en base diez del plásmido ( $10^1$  a  $10^9$ ) para una cuantificación absoluta (Jiang et al., 2015); esta curva permitió relacionar el número de copias del gen con los valores del Ct (Threshold cycle), mediante una regresión lineal (Bustin, 2000), donde se tuvo en cuenta el análisis de *melting curve* (Yoshida et al., 2009) y el método de cuantificación por segunda derivada.

### 2.9.3 Evaluación y análisis de las muestras

La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó con los cebadores indicados en la [tabla 2-1](#), para esta determinación el kit empleado fue LightCycler® 480 SYBR Green en el equipo LightCycler® 480 (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de las muestras, el DNA se normalizó a una concentración de ( $12 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para el gen *amoA*,  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para los genes *nifH*, *amoA.A*, *ALPS* y la familia GH6). La especificidad de los productos amplificados fue confirmada por el análisis de la curva *melting*, donde se observó un solo pico *melting* y una única banda del tamaño esperado en gel de agarosa al 2%. La eficiencia de amplificación fue calculada usando la fórmula  $E = [10^{(-1 \cdot \text{slope}^{-1})} - 1]$  y el número de copias fue normalizado a gramo de suelo seco.

Los posibles efectos inhibitorios sobre la PCR causados por ejemplo por la presencia de ácidos húmicos fueron analizados a través de la determinación de la dilución óptima del DNA de suelo. De igual forma se adicionó albúmina de suero bovino (BSA) a la mezcla de PCR con el fin de disminuir los efectos inhibitorios de los ácidos húmicos. Cada placa

consistió en tres réplicas biológicas independientes, además de estándares del plásmido purificado y controles negativos por triplicado.

## **2.10 Análisis estadísticos**

### **2.10.1 Secuenciación dirigida y metagenómica**

La  $\alpha$ -diversidad de los tratamientos durante el período inicial, degradación, floración y final basados en el gen 16S rRNA fue estimada posterior a la rarefacción de los OTUs/ASVs, los índices de  $\alpha$ -diversidad incluyeron riqueza de OTU/ASVs (DeSantis et al., 2006) y el índice de Shannon (Shannon, 1948). La estimación de la  $\alpha$ -diversidad de la región ITS se determinó luego de la rarefacción de los OTUs e incluyó los índices mencionados con anterioridad. El esfuerzo de muestreo fue estimado por medio de índice Good's coverage (Good, 1953) y las curvas de rarefacción; se emplearon los OTU/ASVs  $\geq 2$  conteos. Para la identificación de las diferencias significativas en los diferentes índices de  $\alpha$ -diversidad tanto bacteriana como fúngica se ejecutó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las evaluaciones fueron desarrolladas en QIIME2 y R<sup>®</sup> empleando los paquetes FSA, lattice, psych, multcompView, y rcompanion (R Core Team, 2019).

Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés), en combinación con un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) basados en la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis, con el fin de visualizar las fuerzas que manejan la variación de la comunidad microbiana y determinar la diversidad beta. Los análisis de *cluster* jerárquico de comunidades bacterianas y fúngicas se basaron en la matriz de disimilaridad mencionada con anterioridad y el algoritmo de agrupamiento empleado fue el método Ward en MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>; Dhariwal et al., 2017) y R<sup>®</sup>. Con el fin de determinar las diferencias entre los OTUs/ASVs de los diferentes tratamientos se realizaron dos análisis, para el tiempo de floración se realizó una prueba de modelo lineal generalizado binomial negativo - DESeq2 (Love et al., 2014) en R<sup>®</sup> y para los otros tiempos, un análisis discriminador lineal teniendo en cuenta el efecto del tamaño – LEfSe (Segata et al., 2011) en Galaxy (<https://usegalaxy.org/>).

Para la identificación de la comunidad microbiana que conforma el *core*, se diferenció el tiempo de floración de los otros tiempos, debido a la naturaleza rizosférica de los datos de floración. La comunidad microbiana *core* del tiempo de floración fue analizada mediante la herramienta MetaCoMet (Metagenomics Core Microbiome Exploration Tool; <https://probes.pw.usda.gov/MetaCoMET/>; Wang et al., 2016), los parámetros empleados fueron: 0.1% de abundancia relativa, empleando la mínima abundancia relativa, y el método de composición, en el diagrama de Venn con los siguientes ajustes: abundancia relativa entre grupos: 0.5 para bacterias y 0.3 para hongos, finalmente se generó un mapa de calor de los microorganismos del *core* mediante medidas de distancia euclidiana y el algoritmo de agrupamiento de Ward. En el caso de los tiempos, inicial, degradación y final, la identificación de los microorganismos pertenecientes al *core* fue realizada en QIIME2, mediante la selección de una fracción mínima de 0.8 y visualizada en R<sup>®</sup> a través del diagrama de Venn donde se seleccionó una persistencia de 100-90, es decir, para ser considerado *core* debe estar presente en todos los tratamientos en los tres tiempos de muestreo.

El análisis de redes de co-ocurrencia fue desarrollado para los tiempos inicial, degradación y final en R<sup>®</sup>, usando la estimación de covarianza de inversión dispersa (SPIEC-EASI). Para cada análisis de la red, *p*-valores fueron obtenidos de 99 permutaciones de selecciones aleatorias de la tabla de datos y sujetos al mismo análisis estadístico. Las correlaciones con una magnitud  $> 0.9$  o  $< -0.9$  y significancia estadística ( $p \leq 0.05$ ) fueron incluidos dentro de los análisis de la red. Los nodos en las redes reconstruidas representan los OTUs, mientras las conexiones corresponden a la correlación entre los nodos. La visualización de la red fue construida usando R<sup>®</sup>.

Las pruebas estadísticas empleadas para la predicción funcional de las secuencias de 16rRNA e ITS, fueron implementadas en STAMP (Statistical analysis of taxonomic and functional profiles, por sus siglas en inglés) (Parks et al., 2014), con el fin de identificar las diferencias estadísticas de los genes de los KO almacenadas en Kegg para los tratamientos, empleando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con posterior corrección de Benjamini-Hoechberg con un valor seleccionado de  $p \leq 0.05$ .

El análisis estadístico de las muestras de metagenómica fue realizado para los KO, así como los números Pfam obtenidos, mediante STAMP, a través de la comparación entre grupos múltiples empleando como método estadístico la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, como test post-hoc Welch's, y Benjamini-Hoechberg como método de corrección con un  $P \leq 0.05$  esto con el fin de determinar si las abundancias relativas de las categorías de los genes funcionales presentaban diferencias significativas.

El análisis estadístico de los genes que codifican para las enzimas activas de carbohidratos (CAZymes) fue realizado mediante STAMP a través de la comparación entre grupos múltiples empleando como método estadístico la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, como test post-hoc Welch's, y Benjamini-Hoechberg como método de corrección con un  $p \leq 0.05$ . Adicionalmente se empleó MicrobiomeAnalyst donde también fueron evaluadas las enzimas activas de carbohidratos que poseían recuentos  $\geq 2$ , donde se eliminó toda enzimas con menos de 10% de prevalencia en las muestras; posteriormente se realizó una transformación tipo *centered log ratio* y el análisis estadístico se realizó empleando metagenomeseq mediante el ajuste *zero-inflated* Gausiano.

### **2.10.2 Actividades enzimáticas**

Las actividades enzimáticas fueron evaluadas empleando cuatro replicas biológicas por tratamiento. Se seleccionó un  $p \leq 0.1$ . Inicialmente se realizó un análisis de interacción tratamiento - localización para determinar si hubo interferencia de la ubicación de los tratamientos con el resultado obtenido, de igual forma se analizó la interacción tratamiento - tiempo mediante la prueba de Scheirer-Ray-Hare, una prueba no paramétrica de análisis de varianza de dos vías, con posterior prueba post hoc Dunn test para la determinación de comparaciones múltiples.

Cuando la interacción fue negativa se procedió a verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilks) (Shapiro & Wilk, 1965) homocedasticidad (Levene y Barlett) (Snedecor & Cochran, 1989). Para aquellos que cumplieron con los supuestos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los promedios de cada una de réplicas, la prueba post-hoc empleado fue Duncan; cuando no se cumplió con los supuestos se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en este caso el test post-hoc empleado fue Dunn.

Las pruebas estadísticas fueron evaluadas en R<sup>®</sup> empleando los paquetes rcompanion, FSA, car, y agricolae (R Core Team, 2019).

### **2.10.3 Genes indicadores**

El análisis estadístico de los genes indicadores se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos y los tiempos de muestreo, inicial, degradación y final. Se seleccionó un  $p \leq 0.1$ , que fue evaluado mediante un ANOVA o Kruskal-Wallis, de acuerdo con el cumplimiento de los supuestos, las pruebas post-hoc empleadas fueron Duncan y Dunn respectivamente. Las pruebas estadísticas fueron evaluadas en el software estadístico R<sup>®</sup> empleando los paquetes FSA, car, y agricolae (R Core Team, 2019).



## 3. Resultados

### 3.1 Análisis físico-químicos

El cultivo de arroz en todos los tratamientos estuvo bajo las mismas prácticas agrícolas, incluyendo los períodos de inundación y drenaje descritos previamente. El análisis físico-químico realizado al final del cultivo en comparación al análisis de diagnóstico del terreno demostró que el pH disminuyó en el punto final en todos los tratamientos. El pH varió de 5.24 en el primer tiempo de muestreo a 5.06 (RS-B), 4.98 (RS-MMO), 4.91 (RS-IMO) y 4.90 (RS-M), con diferencias significativas entre RS-B y RS-M ( $p = 0.02$ ) ([Anexo C](#)).

Las otras propiedades químicas del suelo, como K, Na, Al, P y N no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos durante el experimento ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, los niveles de Ca, Mg, Na y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) disminuyeron en el tiempo de cosecha, mientras los niveles de Al incrementaron en todos los tratamientos. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas. El P tuvo un incremento de alrededor de 17% en el tiempo en los tratamientos RS-IMO y RS-B, pero permaneció similar al valor inicial en los otros tratamientos. De manera similar el carbono orgánico en el tiempo en relación con el tiempo inicial (44.0%) incrementó con valores de los tratamientos en 54.5% (RS-MMO), 61.4% (RS-M), 61.4% (RS-IMO) y 56.8% (RS-B), aunque sin diferencias estadísticas entre ellos ( $p > 0.05$ ) ([Anexo C](#)).

### 3.2 Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo

El rendimiento del cultivo fue relativamente alto en todos los tratamientos (alrededor de 12 ton·ha<sup>-1</sup>), sin diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar de esto, el tratamiento RS-M produjo 1 ton·ha<sup>-1</sup> menos en comparación a los otros tratamientos. Variables agronómicas como altura de la planta y llenado de granos (%) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con excepción de la altura de la planta, que

presentó valores más altos en el tratamiento RS-B en comparación a los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3-1).

**Tabla 3-1:** Efecto del manejo del tamo de arroz, sobre variables agronómicas e incidencia de patógenos. ANOVA-Tukey ó Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$   $n = 4$ .

		Tratamientos			
		RS-MMO	RS-IMO	RS-B	RS-M
<b>Variables agronómicas</b>	Altura de la planta (cm)	99.2 <b>ab</b>	100.7 <b>ab</b>	101.5 <b>a</b>	98.1 <b>b</b>
	Rendimiento (Kg·ha <sup>-1</sup> )	13.1	13.4	13.1	12.1
	Grano vacío (%)	11.5	14.2	15.7	11.2
<b>Patógenos (% incidencia)</b>	<i>Burkholderia sp.</i>	0	0	0	0
	<i>Rhizoctonia sp.</i>	6.7 <b>b</b>	14.9 <b>a</b>	6.7 <b>b</b>	10.9 <b>ab</b>
	<i>Gaeumannomyces sp.</i>	98.1	80.5	89.0	100
	<i>Pyricularia sp.</i>	28.5	57.5	32.9	17.8
	<i>Helminthosporium sp.</i>	16.9 <b>a</b>	11.4 <b>b</b>	17.8 <b>ab</b>	33.0 <b>a</b>

Valores de los promedios de las variables agronómicas o el porcentaje de incidencia de patógenos con la misma letra no difieren significativamente. La altura de la planta en cm fue tomada en el último tiempo de muestreo (Tiempo de cosecha). RS-MMO: tamo de arroz dejado en cobertura con aplicación de inóculo microbiano; RS-IMO: tamo de arroz con aplicación de inóculo microbiano y posterior incorporación al suelo; RS-B: tamo de arroz quemado con posterior incorporación de las cenizas y RS-M: tamo de arroz dejado en cobertura.

En cuanto al estado fitosanitario del arroz al tiempo de cosecha, se logró la identificación de las siguientes patologías asociadas al cultivo: 1. Marchitez de la hoja relacionada a *Helminthosporium oryzae*. 2. Mancha café o añublo del arroz asociada al patógeno *Pyricularia oryzae*. 3. Tizón de la vaina generado por *Rhizoctonia solani* y 4. Pudrición de la vaina asociado a *Gaeumannomyces graminis var. graminis*. Es de destacar que a pesar de que uno de los patógenos que más se reportó en el ciclo de cultivo anterior en el municipio de Saldaña fue *Burkholderia sp.*, (G. Garcés, comunicación personal, 17 de

octubre de 2016) en el ciclo de cultivo del ensayo, no se reportó la presencia de este patógeno.

*Gaeumannomyces graminis* var *graminis* reveló la más alta incidencia en todos los tratamientos (~91.9%), pero sin diferencias estadísticas entre ellos ( $p = 0.75$ ). La incidencia de *Pyricularia oryzae* estuvo en promedio en 34.2% y al igual que el patógeno anterior no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $p = 0.26$ ). En contraste *Helmintosporium oryzae*, presentó un mayor porcentaje de incidencia en el tratamiento RS-M (33.0%), presentando diferencias significativas ( $p = 0.07$ ) frente a RS-IMO (11.4%) cuando se compararon todos los tratamientos. Finalmente, el patógeno *Rhizoctonia solani* también presentó una baja incidencia, donde los tratamientos RS-B (6.7%) y RS-MMO (6.7%) disminuyeron significativamente la incidencia en comparación con el tratamiento RS-IMO (14.9%) ( $P = 0.07$ ) (Tabla 3-1).

### **3.3 Objetivo 1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz**

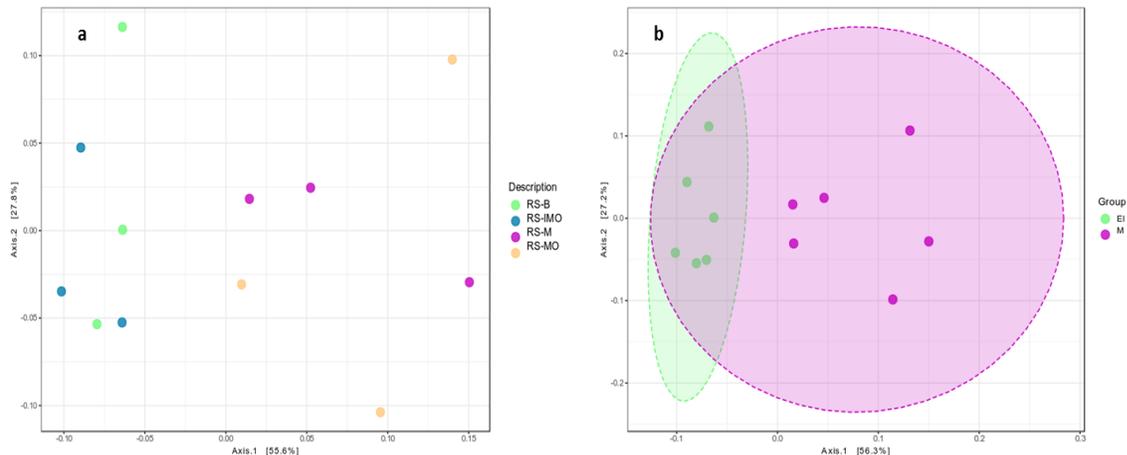
#### **3.3.1 Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo rizosférico en tiempo de floración**

Un total de 803.226 secuencias parciales del gen 16S rRNA fueron obtenidas en la etapa de floración. Después del filtro de calidad se obtuvo un total de 408.009 lecturas de la calidad deseada, con un promedio de 25.789 lecturas por muestra y un total de 1.122 diferentes variantes de secuencia de amplicones (ASVs por sus siglas en inglés) a partir de todas las muestras.

El análisis de rarefacción demostró que el esfuerzo de secuenciación fue suficiente para capturar la mayoría de la diversidad bacteriana en los diferentes tratamientos (Anexo D). Aunque la comunidad bacteriana fue diversa, no se presentaron diferencias estadísticas en la alfa diversidad entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Anexo E). Sin embargo, el análisis de beta diversidad mostró que los tratamientos se separaban en dos grupos, tal como se observa en el PCoA (Figura 3-1) a pesar de no presentar diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

El primer grupo fue conformado por los tratamientos donde se dejó el TA en cobertura, es decir, RS-MMO y RS-M, este grupo fue denominado *M* (por la palabra *mulch* o cobertura en español). El segundo grupo estaba conformado por los tratamientos donde el TA fue incorporado al suelo de manera temprana, estos fueron RS-IMO y RS-B, el grupo fue denominado *EI* (por las palabras *early incorporation* o incorporación temprana en español). De esta manera para los análisis subsecuentes se agrupó y se comparó el grupo *M* contra el grupo *EI*. Cuando se realizó esta comparación, el PCoA reveló diferencias estadísticas entre los grupos (PERMANOVA –  $R^2 = 0.15$ ;  $F = 1.78$ ;  $p = 0.007$ ) (Figura 3-1). Un análisis de agrupamiento jerárquico basados en todos los ASVs de todos los tratamientos confirmó la presencia de los grupos de tratamientos *EI* y *M* (Anexo F).

**Figura 3-1:** Distribución de la estructura de la comunidad bacteriana ( $\beta$ -diversidad) en suelo rizosférico a tiempo de floración. El Análisis coordinado principal (PCoA) de (a) comunidad bacteriana total y (b) la comunidad bacteriana agrupada en los tratamientos de cobertura (*M*) y los tratamientos tempranamente incorporados (*EI*) basados en un PERMANOVA realizado sobre la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis.



La microbiota bacteriana de la rizósfera de arroz de todos los tratamientos la conformaron 18 filos. El taxón dominante corresponde a las *Proteobacterias* (42%), seguido por *Bacteroidetes* (9%), *Firmicutes* (8%), *Cyanobacterias* (8%), *Epsilonbacteraeota* (6%) y *Acidobacteria* (6%) en promedio de abundancia relativa (AR). En total, más del 79% de todos los ASVs detectados fueron asociados con estos seis taxones (Anexo G). La abundancia relativa a nivel de filos no fue estadísticamente significativa entre tratamientos. Sin embargo, después de separar los tratamientos en el grupo de las coberturas (*M*) y los

tempranamente incorporados (*EI*), se encontraron diferencias en *Proteobacteria* ( $p = 0.024$ ), *Epsilonbacteraeota* ( $p = 0.024$ ), *Bacteroidetes* ( $p = 7.03E-4$ ) y *Acidobacteria* ( $p = 0.007$ ) ([Anexo G](#)).

En el filo de las *Proteobacterias*, a nivel de clase, las *Gamma-Proteobacterias*, fueron las más abundantes, representó el 32.1% en AR entre todos los tratamientos, siendo más elevada la AR en los tratamientos del grupo *EI* con un 35.2% frente a los tratamientos del grupo *M* con 28.9%, resultando en una diferencia estadística significativa ( $p = 0.019$ ). Las clases *Bacteroidia* ( $p = 0.0022$ ) y *Campylobacteria* ( $p = 0.051$ ), fueron más abundantes en los tratamientos del grupo *EI* (AR 11.0% y 8.3% respectivamente), comparados contra el grupo *M* (abundancia relativa 7.7% y 5.5% respectivamente). Las *Acidobacterias* ( $p = 1.045E-4$ ) por su parte se encontraban aumentadas en los tratamientos del grupo *M* (7.1%) en comparación con los tratamientos del grupo *EI* (3.7%) ([Anexo H](#)).

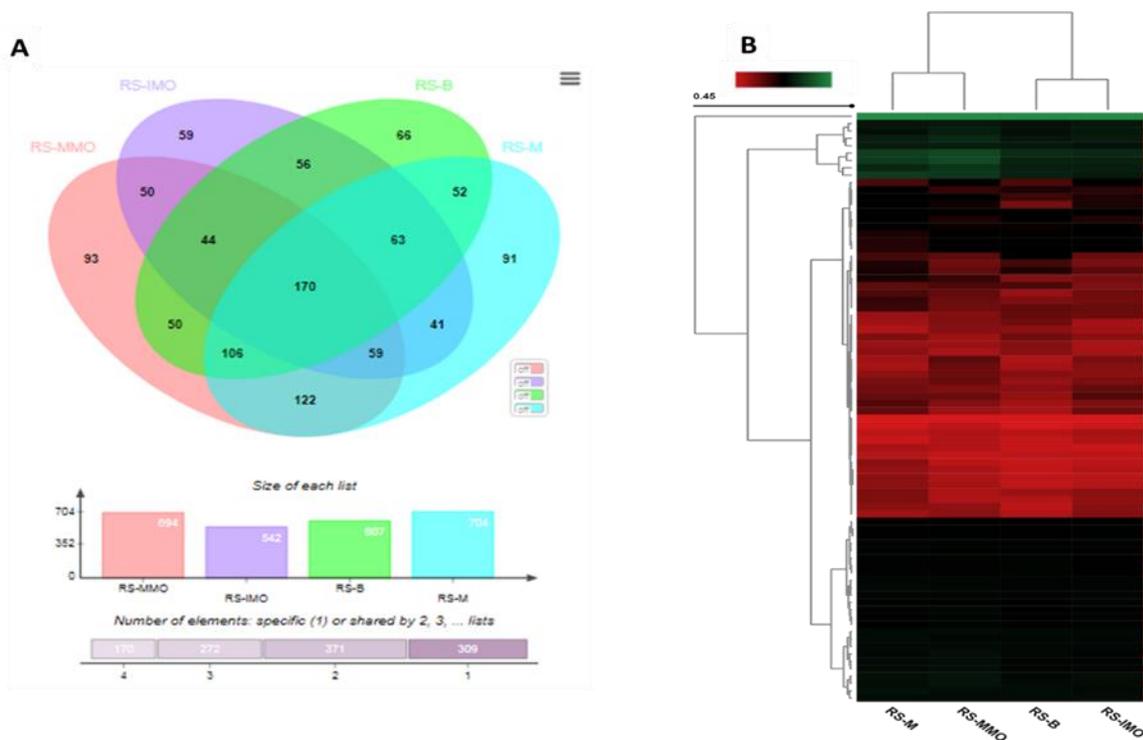
A nivel de familia, la familia *Burkholderiaceae* fue el taxón dominante (12.4% en promedio entre todos los tratamientos), seguido por las familias *Sulfuricellaceae*, *Sulfurospirillaceae*, *Chitinophagaceae* y *Aeromonadaceae*, con promedios de AR de 7.6%, 6.2%, 4.0% y 2.9%, respectivamente ([Anexo I](#)). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Caso contrario ocurrió con la familia *Tannerellaceae*, significativamente mayor ( $p = 0.002$ ) en tratamientos agrupados como *EI* (1.06%) en comparación con los tratamientos del grupo *M* (0.19%) ([Anexo I](#)).

A nivel taxonómico de género, los promedios de las AR permitieron identificar a *Ferritrophicum* (7.6%), *Sulfurospirillum* (6.2%), *Comamonas* (4.1%), *Polaromonas* (2.9%), *Aeromonas* (2.9%), *Bacillus* (2.2%) y *Bradyrhizobium* (2.0%) como los géneros más abundantes, sin diferencias significativas entre los tratamientos ([Anexo J](#)). Es importante resaltar que *Bryobacter* ( $p = 0.0025$ ) y *Micromonospora* ( $p = 0.036$ ) mostraron mayor abundancia relativa en los tratamientos del grupo *M* (1.7% y 1.3% respectivamente) que en los tratamientos del grupo *EI* (0.8% y 0.8% respectivamente) ([Anexo J](#)).

El core es definido como la mínima comunidad de ASVs compartidos entre todos los cuatro tratamientos: El core en este estudio fue explorado a través del programa MetaCoMET, estableciéndose que está conformado por 170 ASVs y corresponde al 15% de todo el microbioma bacteriano. En cada nivel de filogenia la dicotomía entre los tratamientos de los grupos *M* y *EI* fue confirmada ([Figura 3-2](#)). A nivel de filo los niveles de *Actinobacteria*

y *Proteobacteria* en el grupo de tratamientos *M* (3.31% y 4.09% respectivamente) excedió los del grupo de tratamientos *EI* (2.37% y 3.76 respectivamente), mientras *Epsilonbacteraota* fue mayor en el grupo *EI* (2.06%) frente a los tratamientos del grupo *M* (1.50%).

**Figura 3-2:** Core de la comunidad bacteriana. (A) El diagrama de Venn muestra las particiones de variación en la composición de la comunidad bacteriana. (B) Análisis de agrupamiento jerárquico y mapa de calor empleando la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis y el método de Ward para calcular la distancia. Las filas se agrupan de acuerdo con la filogenia a nivel de género (los nombres se han eliminado de la gráfica con el fin de visualizar la figura en su totalidad), mientras las columnas se agrupan de acuerdo al tratamiento.



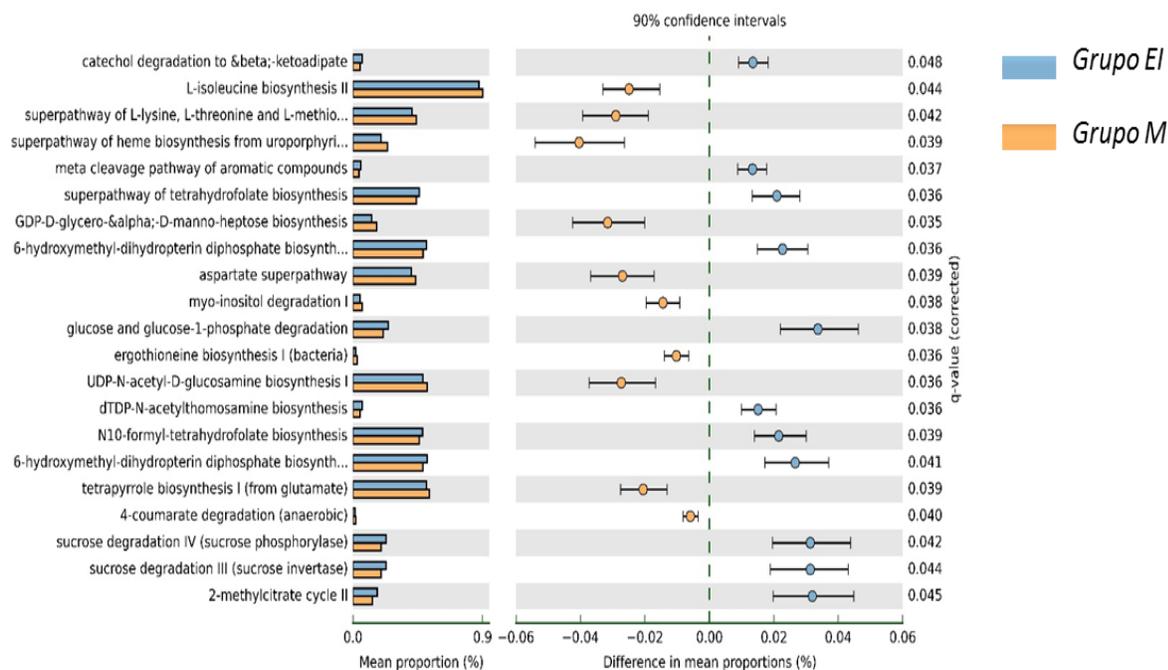
A nivel de orden, *Campylobacteriales* fue mayor en los tratamientos del grupo *EI* (2.06%) frente a los del grupo *M* (1.5%), mientras los órdenes *Rhizobiales*, *Chloroflexales* y *Micromonosporales*, fueron mayor en los tratamientos del grupo *M* (8.49%, 3.27% y 1.77%, respectivamente), que en los tratamientos del grupo *EI* (6.64%, 2.70% y 1.20%, respectivamente), sin presentar diferencias estadísticas significativas.

*Sulfurospirillum* fue el género más común en el *core*, con 16.8% de AR entre todos los tratamientos. Sin embargo, *Comamonas* (con 7% de AR en promedio), *Bradyrhizobium*, y *Flavisolibacter* (con 5% de AR cada uno) y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (4% AR), también fueron de importancia en la formación del *core*. En detalle, *Sulfurospirillum* mostró un 19.7% de AR en los tratamientos del grupo *EI*, frente a un 13.9% en los tratamientos del grupo *M*; *Micromonospora* fue más abundante en el grupo *M* (1.7% en promedio) comparado con el grupo *EI* (1.2%), sin diferencias estadísticas significativas.

Con el objeto de llevar a cabo una predicción funcional de la comunidad bacteriana presente en cada tratamiento se empleó el programa PICRUS2, lo que reveló diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los grupos de tratamientos *EI* y *M*. La predicción mostró diferencias en 21 funciones, de las cuales 11 tenían una mayor proporción en el grupo *EI* frente a 10 para el grupo *M*. Estas funciones abarcaron procesos biosintéticos y procesos de degradación. En detalle, el número de procesos de biosíntesis fue mayor en el grupo *M* (10) en comparación al grupo *EI* (6), mientras el número de procesos de degradación fue mayor en el grupo *EI* (5) frente al grupo *M* (3).

La predicción arrojó que la mayoría de los procesos biosintéticos hacen referencia a la biosíntesis de aminoácidos (lisina, treonina, metionina, glicina y aspartato, entre otros) la síntesis de DNA y la producción de energía; mientras que los procesos de degradación se encuentran involucrados en la degradación de fuentes de carbono simples (sacarosa, glucosa) y complejas (catecol), así como degradación de compuestos fosforados (mio-inositol) (Figura 3-3).

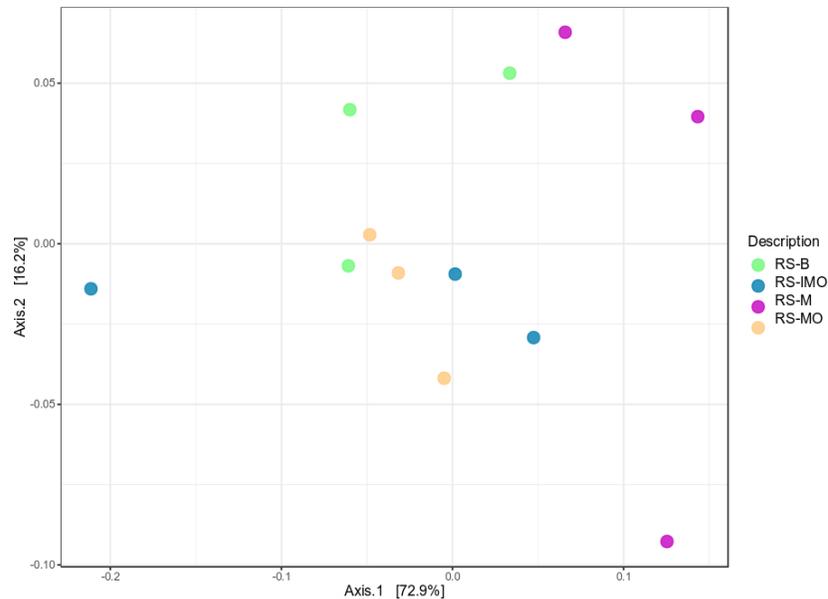
**Figura 3-3:** Predicción funcional bacteriana usando PICRUS2. Los análisis estadísticos para la comparación entre los grupos cobertura (*M*) e incorporados tempranamente (*EI*) se realizaron mediante el test de Welch con corrección de Bonferroni, con un  $p \leq 0.05$ , en el software STAMP. n=6.



### 3.3.2 Composición, estructura y función de la comunidad fúngica en suelo rizosférico en tiempo de floración

A partir de las 12 muestras de suelo rizosférico, se obtuvo un total de 1.363.746 secuencias. Después del proceso de filtrado de calidad, se obtuvo un total de 1.177.977 secuencias con un promedio de 67.324 lecturas por muestra. Finalmente, se obtuvo un total de 932 unidades taxonómicas operacionales (OTU, por sus siglas en inglés), identificando 132 filotipos. El análisis de rarefacción indicó que el esfuerzo de muestreo fue suficiente para capturar la mayoría de la diversidad fúngica ([Anexo D](#)). La comunidad fúngica presentó baja diversidad alfa en comparación a la comunidad bacteriana. Por otra parte, no se presentaron diferencias estadísticas en la diversidad alfa y beta entre los tratamientos ([Anexo E](#)); la beta diversidad fúngica fue inspeccionada con PERMANOVA ( $R^2 = 0.29$ ;  $F = 1.09$ ;  $P = 0.34$ ) ([Figura 3-4](#)).

**Figura 3-4:** Distribución de la estructura de la comunidad fúngica ( $\beta$ -diversidad) en suelo rizosférico a tiempo de floración. El Análisis coordinado principal (PCoA) basados en un PERMANOVA realizado sobre la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis.



*Ascomycota*, fue el filo más abundante (52.1% del total de secuencias, en promedio entre los cuatro tratamientos), seguido por *Chytridiomycota* (0.37%), *Mortierellomycota* (0.23%), *Rozellomycota* (0.29%) y *Basidiomycota* (0.23%) como los cinco filios principales. Sin embargo, aproximadamente 44.5% de las secuencias de los hongos no fueron asignados a ningún grupo taxonómico específico (Anexo K).

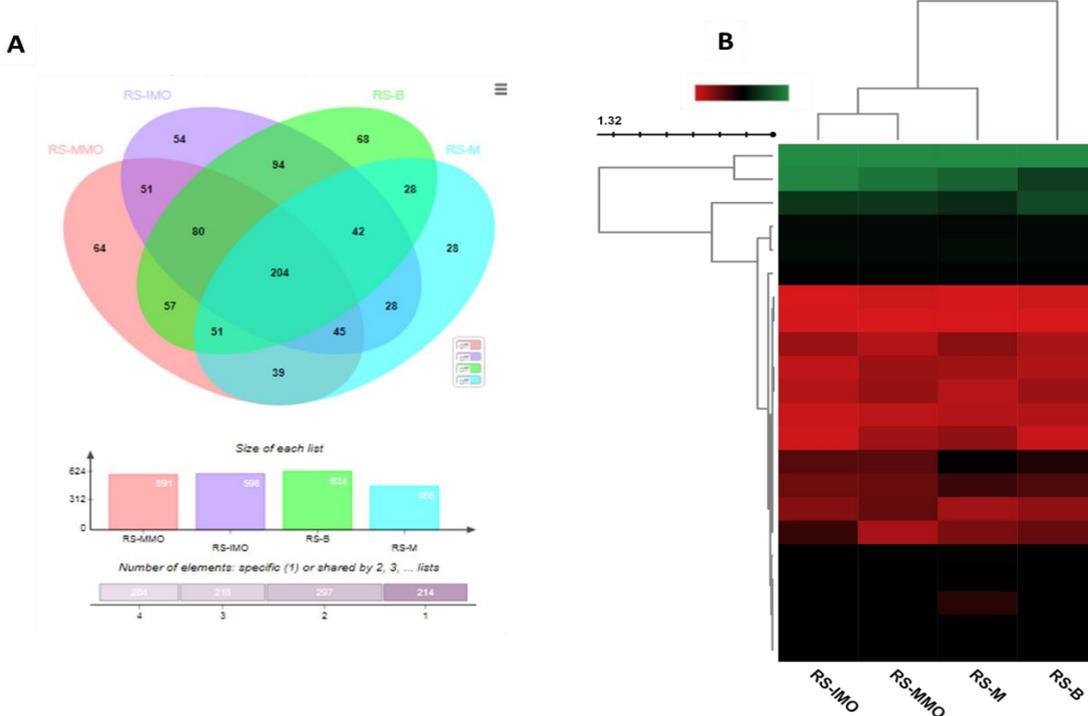
A nivel de orden 27 taxones fueron identificados, siendo *Sordariales* (23.5%), *Pleosporales* (3.4%), *Hypocreales* (1.2%) y *Eurotiales* (0.78) los más abundantes entre todos los tratamientos (Anexo K). *Sordariales* e *Hypocreales* mostraron bajas AR en el tratamiento RS-B (1.4% y 0.9%, respectivamente) comparados con los otros tratamientos (2.6% y 1.2% en promedio, respectivamente). Por otro lado, *Eurotiales* presentó mayor AR en RS-B (1.1%) en comparación a los otros tratamientos (0.6% en promedio).

Entre todos los géneros, los más abundantes fueron *Penicillium* (0.3%), *Edenia* (0.27%), *Aspergillus* (0.23%), *Lagena* (0.22%) y *Talaromyces* (0.19%). A pesar de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los géneros mencionados con anterioridad, es importante mencionar que *Penicillium* y *Edenia* presentaron mayores valores de AR en el tratamiento RS-B (0.69% y 0.58% respectivamente) frente a otros tratamientos (0.17% *Penicillium* y 0.17% *Edenia*, promedio de los tratamientos RS-MMO, RS-IMO y RS-M). Por otra parte, *Sarocladium* tuvo una AR

significativamente mayor en el tratamiento RS-MMO frente al tratamiento RS-B (0.29% vs 0.02%;  $p = 0.0018$ ) (Anexo L). Vale la pena mencionar que la gran mayoría (92.5%) de OTUs fúngicos, no pudieron ser asignados a nivel de género.

En cuanto al *core* fúngico, fue conformado por 204 OTUs, lo que corresponde a 21.86% del microbioma fúngico (Figura 3-5). Notablemente, 42% de las secuencias no pudieron ser asignadas más allá del dominio hongo. *Ascomycota* fue el filo más dominante, con un 57% de AR. A nivel de orden, *Sordariales* y *Pleosporales* fueron los taxones más abundantes en el *core*, con 30% y 4% respectivamente de AR entre todos los tratamientos.

**Figura 3-5:** *Core* de la comunidad fúngica. (A) El diagrama de Venn muestra las particiones de variación en la composición de la comunidad fúngica bacteriana. (B) Análisis de agrupamiento jerárquico y mapa de calor empleando la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis y el método de Ward para calcular la distancia, las filas se agrupan de acuerdo con la filogenia a nivel de orden (los nombres se han eliminado de la gráfica con el fin visualizar la figura en su totalidad), mientras las columnas se agrupan de acuerdo al tratamiento.



El mapa de calor generado a partir de *core* donde se emplearon las secuencias agrupadas a nivel de orden indica de manera clara que los tratamientos con tamo de arroz (RS-IMO,

RS-MMO y RS-M) fueron agrupados a nivel de orden (Figura 3-5), dejando el tratamiento de quema como un grupo único. Además, los tratamientos de tamo de arroz donde se aplicaron microorganismos formaron un grupo único (RS-MMO y RS-IMO) (Figura 3-5), basado en diferencias puntuales en términos de AR de los taxones dominantes, sin diferencias estadísticas significativas entre ellos.

Para la predicción funcional se empleó el programa FUNGuild, donde se evidenció que solo un 10.7% del total de OTUs, pudo ser asignado a uno de los tres principales modos tróficos como son patótrofos, saprotrofos y simbiótrofos, además de sus posibles combinaciones (Figura 3-6). De esta manera, 22 rasgos funcionales fueron identificados, la mayoría de ellos asociados a saprotrofos no definidos (74.8% AR), saprotrofos de plantas y estiércol (12.5% AR) y patógenos de plantas (5.4% AR). Otros rasgos funcionales se presentaron en abundancia menores de 1%; estos fueron saprotrofos de estiércol, patógenos de animales, micorrizas de orquídeas, ectomicorrizas, endófitos, saprotrofos de madera, endomicorrizas, briofitos y epifitos, entre otros. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los rasgos analizados entre los tratamientos.

**Figura 3-6:** Abundancia relativa de rasgos funcionales de la comunidad fúngica. El gráfico de barras muestra el promedio de abundancia de tres replicas por tratamiento.



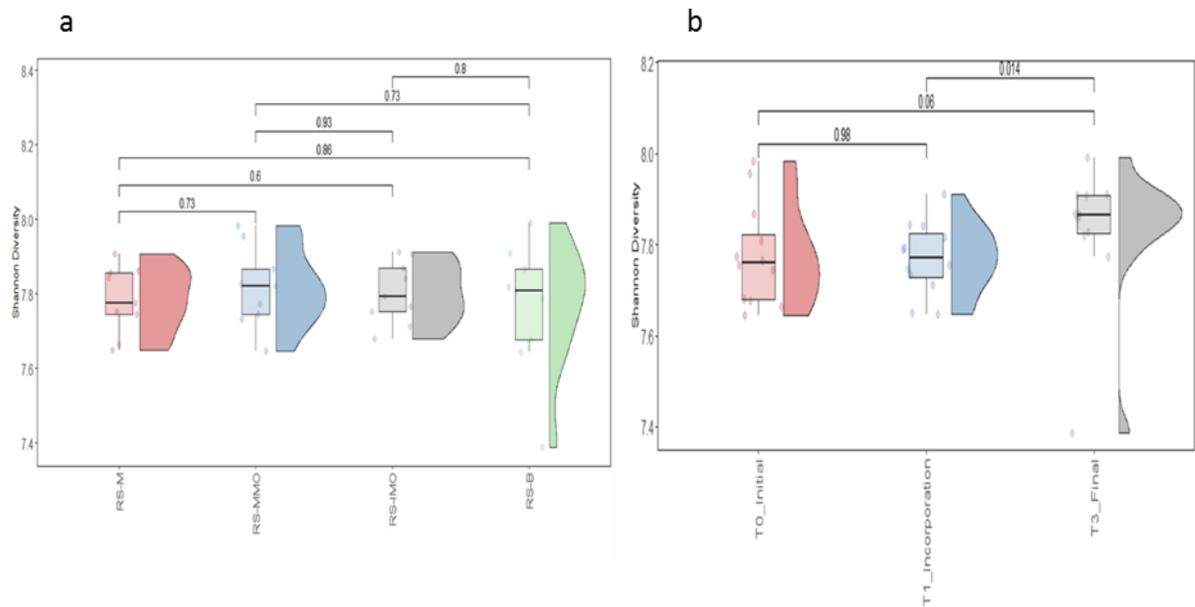
### 3.3.3 Estructura y composición de la comunidad bacteriana en suelo de soporte en los tiempos inicial, degradación y final

Los datos crudos arrojaron un total de 1.061.369 secuencias. Con un mínimo conteo de 16.955 y un máximo conteo de 28.781 secuencias, y un total de 22.292 OTUs representativos. Los análisis fueron realizados de dos formas: **I.** Evaluación tiempo a tiempo, donde los cuatro tratamientos fueron evaluados y comparados entre sí en cada uno de los tiempos, inicial, degradación y final (n=3); **II.** Evaluación a través del tiempo, donde se evaluó cada tratamiento (n=3) a través del tiempo; y **III.** Evaluación de todos los tratamientos en todos los tiempos (n=12), donde se evaluaron, todos los tratamientos en todos los tiempos, comparando los tratamientos y tiempos entre sí.

Los análisis de rarefacción realizados sirvieron para determinar la riqueza de los taxones observados frente al esfuerzo de muestreo, como resultado las muestras son comparables entre ellas a pesar de que el esfuerzo de muestreo fue insuficiente para capturar la mayoría de la diversidad bacteriana, al no alcanzar la asíntota en la curva ([Anexo M](#)).

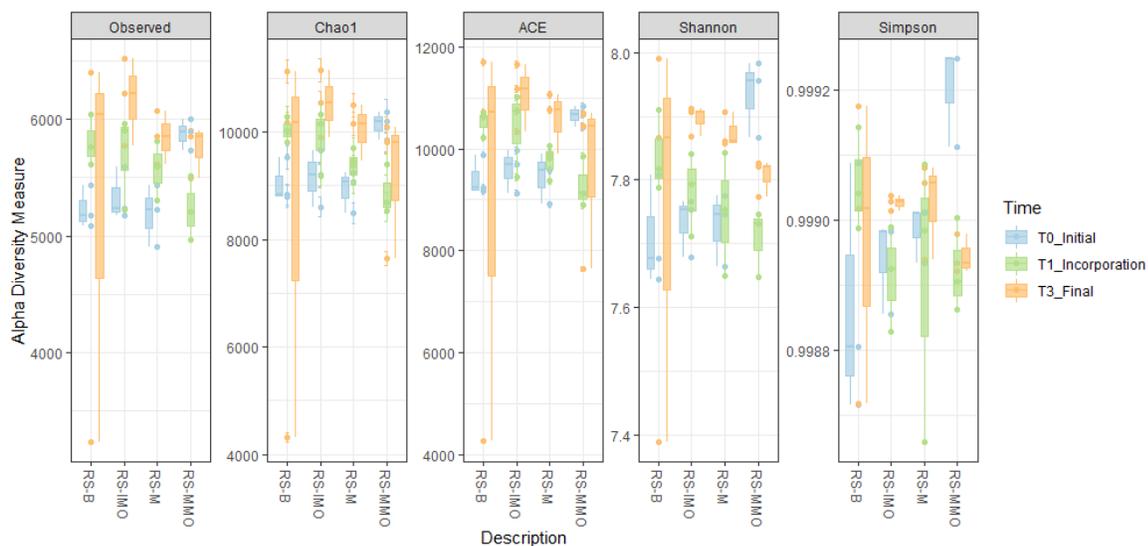
La diversidad alfa fue evaluada a través del índice de Shannon donde no se encontró diferencias entre los tratamientos, pero si se presentaron diferencias a través del tiempo ([Figura 3-7](#)), entre los tiempos inicial y de degradación comparados frente al tiempo final.

**Figura 3-7:** Índice de diversidad de Shannon en los tiempos inicial, degradación y final. Evaluado entre tratamientos (a) y entre tiempos (b). El *p*-valor se muestra en la parte superior de las barras e indica comparaciones entre los tratamientos (n=3) (a) o entre los tiempos (n=3) (b).



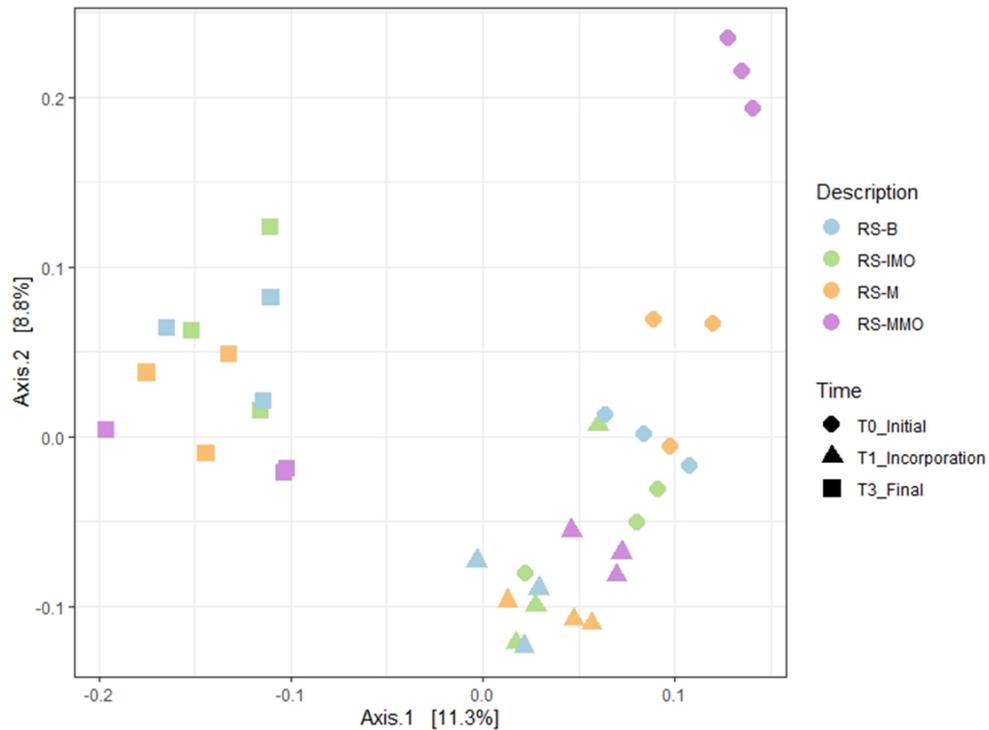
Sin embargo, cuando se analizaron todos los tratamientos en todos los tiempos, si se presentaron diferencias estadísticas significativas. Este patrón fue confirmado con varios índices de diversidad: índice de diversidad de Shannon ( $p = 0.030$ ), diversidad filogenética de Faith ( $p = 0.022$ ) y el índice de equidad de Pielou ( $p = 0.021$ ), adicionalmente se evaluó el índice de Simpson, Chao1 y ACE donde se mostró un incremento de la diversidad a lo largo del tiempo (Figura 3-8).

**Figura 3-8:** Diversidad alfa para la comunidad bacteriana de los tiempos inicial, degradación y final. En la gráfica se presenta el número de OTUs observados, el índice de Chao1, el estimador ACE, el índice de Shannon y el índice de Simpson, evaluados mediante la comparación de todos los tratamientos en todos los tiempos ( $n=12$ ).



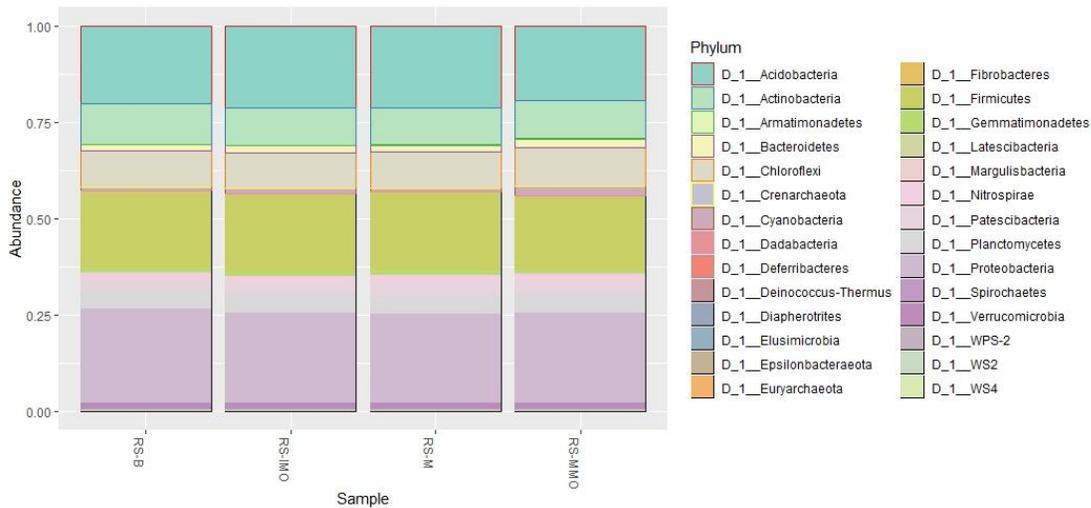
El análisis coordinado principal evidenció el agrupamiento de las comunidades bacterianas a partir del suelo de soporte con los dos primeros ejes logrando explicar en un 20.1% el total de la variación (Figura 3-9). Dicho análisis no evidenció diferencias estadísticas significativas a nivel de tratamientos o tiempos, sin embargo, se logra visualizar la separación del tiempo final frente a los otros dos tiempos de muestreo, empleando cualquiera de las matrices (Bray-Curtis  $p = 0.52$ ; Jaccard,  $p = 0.41$ ; weighted Unifrac,  $p = 0.68$ ; unweighted Unifrac,  $p = 0.702$ ) (Anexo N).

**Figura 3-9:** Diversidad beta para la comunidad bacteriana de los tiempos inicial, degradación y final. Análisis coordinado principal (PCoA) de la comunidad bacteriana de los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo, realizado sobre la matriz de disimilaridad de Bray-Curtis. PERMANOVA, con 999 permutaciones.



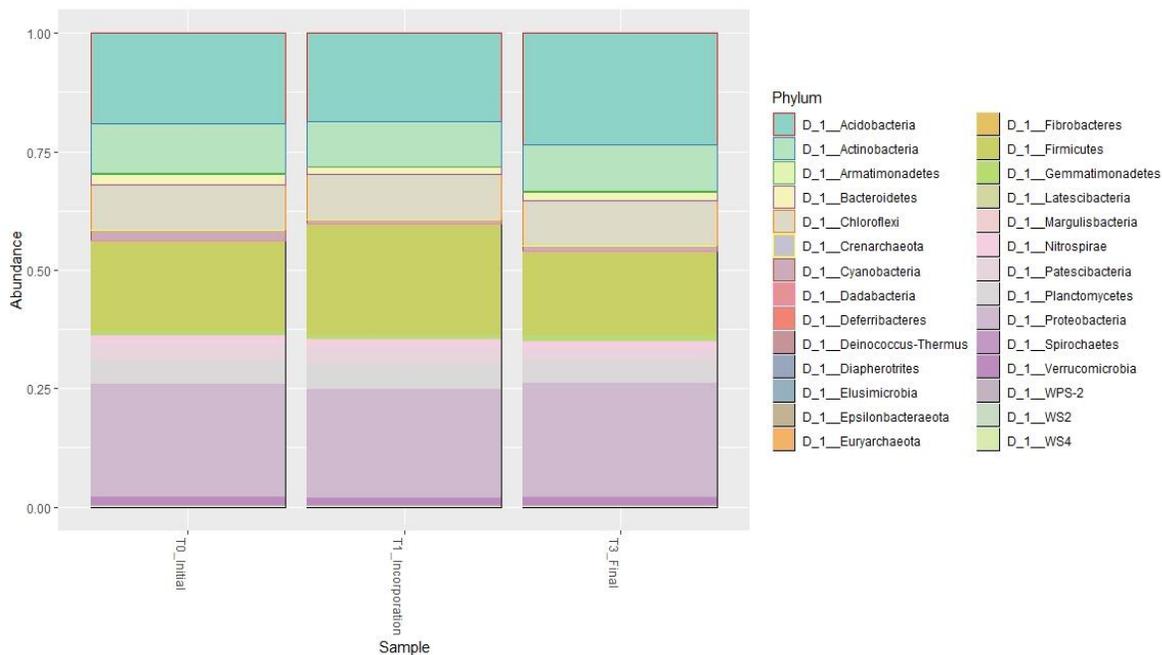
A nivel taxonómico, se logró identificar un total de 28 filos, los cinco más abundantes pertenecen a las *Proteobacterias*, seguido por *Acidobacterias*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Chloroflexi* (Figura 3-10). Cerca del 0.003% de la población no se encuentra asignada a nivel de filo.

**Figura 3-10:** Comparación de las distribuciones de los 28 filos presentes en la comunidad bacteriana de suelo de soporte en cada uno de los tratamientos. El gráfico presenta la abundancia relativa de cada taxón para las tres réplicas de cada uno de los tratamientos en cada tiempo de muestreo.



Es importante recalcar que cuando se visualizan ya sea los cuatro tratamientos (Figura 3-10) o los tres tiempos de muestreo (Figura 3-11) se observan variaciones en términos de la AR, que posteriormente fueron analizadas para determinar diferencias estadísticas significativas.

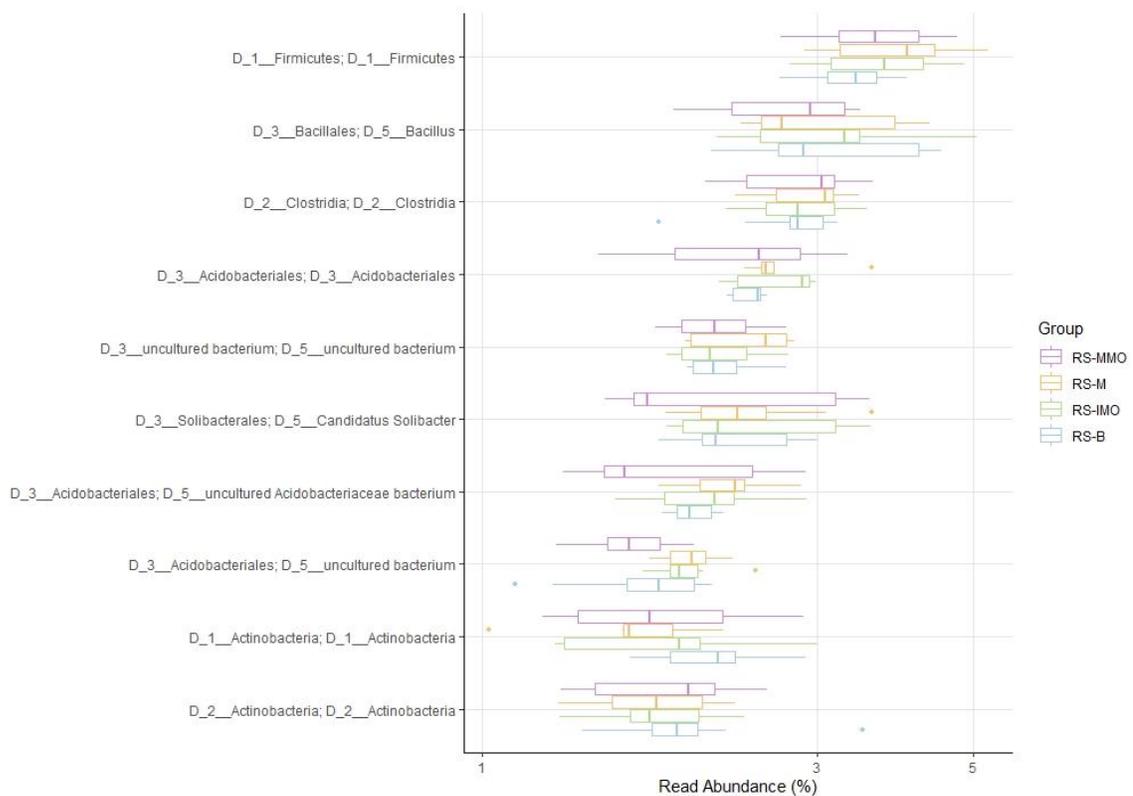
**Figura 3-11:** Comparación de las distribuciones de los 28 filis presentes en la comunidad bacteriana de suelo de soporte en los diferentes tiempos de muestreo. El gráfico presenta la abundancia relativa de cada uno de los taxones para cada uno de los tiempos



Las seis clases más abundantes a través de todos los tiempos fueron: *Acidobacteriia*, *Alfa-Proteobacteria*, *Clostridia*, *Gamma-Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacilli* que representaron el 70% de las AR. Mientras que a nivel de orden los *Acidobacteriales*, *Solibacterales*, *Betaproteobacteriales*, *Clostridiales*, *Bacillales* y *Rhizobiales* fueron los más abundantes y representaron el 31% de las AR.

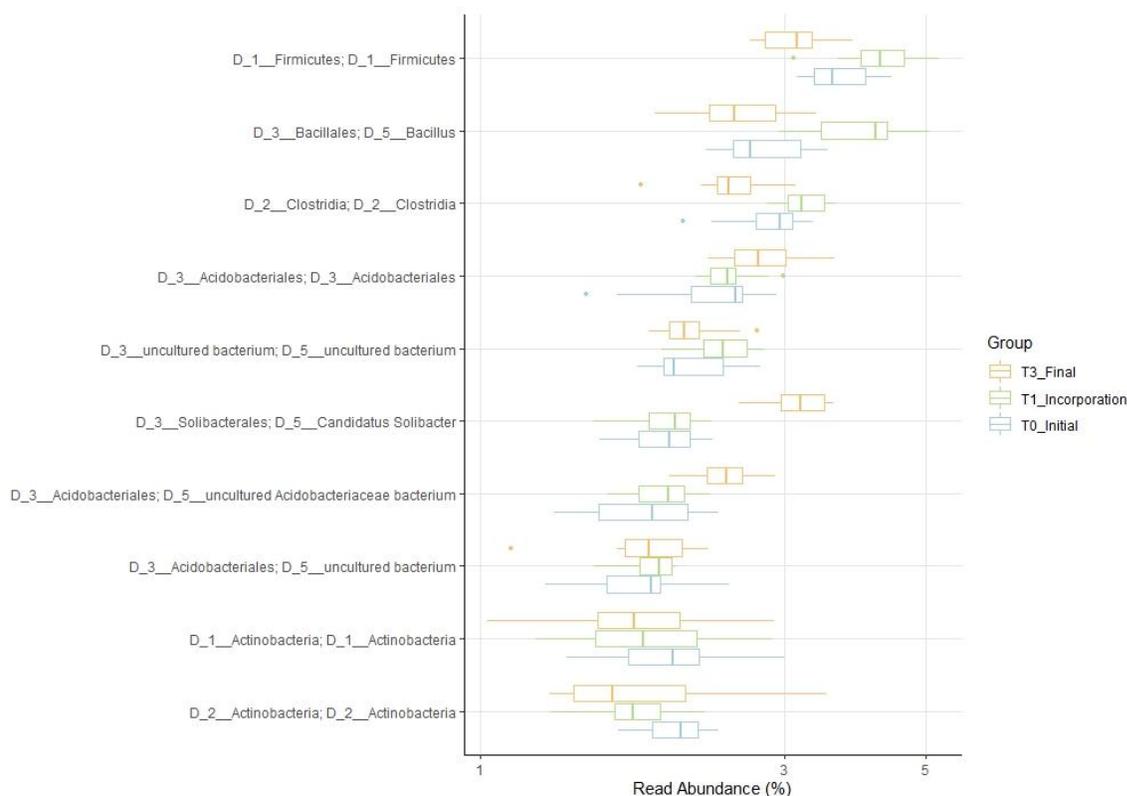
Finalmente, cuando se realizó el análisis a nivel de género, entre los diez taxones más abundantes se identificó *Bacillus* y *Ca. Solibacter* (Figura 3-12). Los otros taxones a pesar de que no fueron dilucidados a nivel de género pertenecen principalmente al filo *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Otros géneros detectados entre los más abundantes pero que no hacen parte del *top ten* fueron *Bryobacter*, *Clostridium sensu stricto 8*, *Bradyrhizobium*, *Ca. Koribacter* y *Streptomyces*.

**Figura 3-12:** Distribución de los diez taxones más abundante identificados a nivel de género en los diferentes tratamientos. El gráfico presenta la abundancia relativa de cada uno de los taxones para cada uno de los tratamientos.



Cuando se visualizaron los diez géneros más abundantes a través del tiempo de cultivo, no se encontraron diferencias significativas entre los microorganismos más abundantes en los diferentes tratamientos. Sin embargo, cabe recalcar que la AR aumentó especialmente en el tiempo final a comparación de los otros dos tiempos (inicial y de degradación) en *Acidobacteriales* y *Solibacterales*; mientras que para *Clostridia*, *Bacillus* y *Firmicutes* el incremento en AR se produjo en el tiempo de degradación y disminuyó para el tiempo final (Figura 3-13).

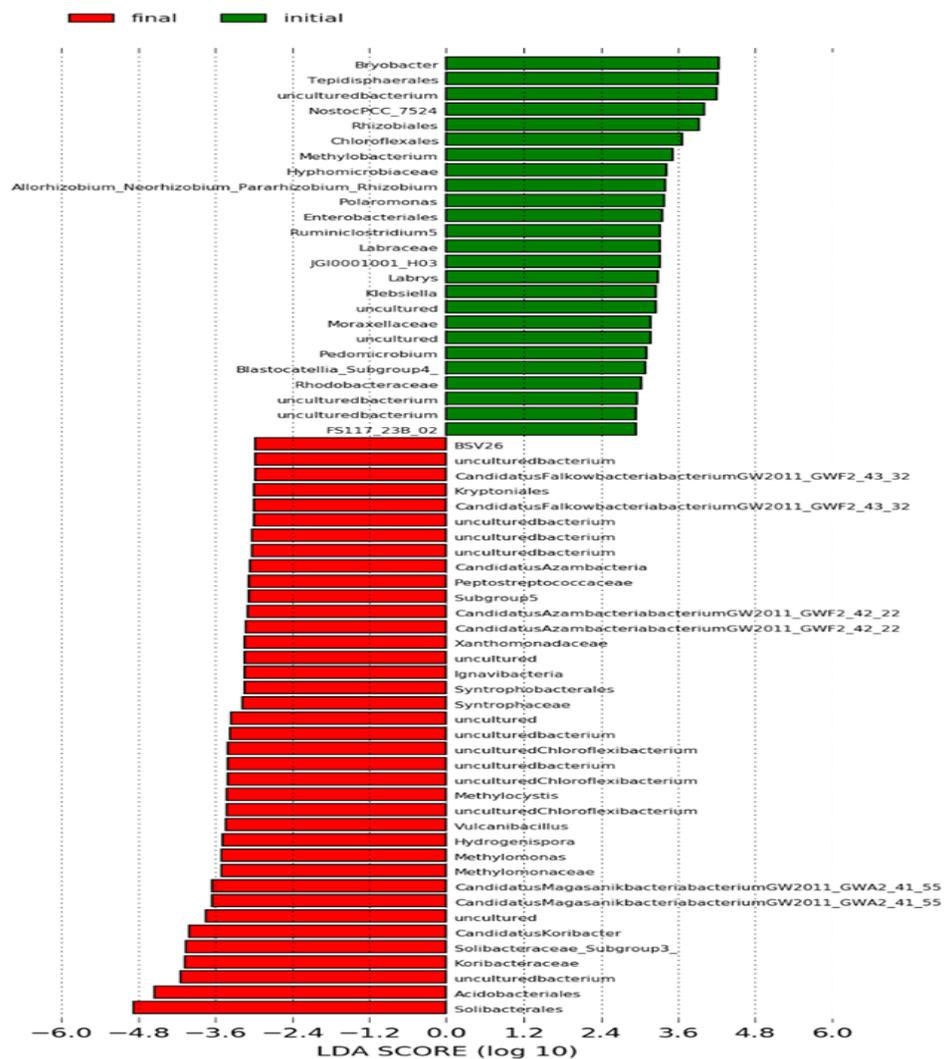
**Figura 3-13:** Distribución de los diez taxones más abundante identificados a nivel de género en los diferentes tiempos. El gráfico presenta la abundancia relativa de cada uno de los taxones para cada uno de los tiempos de muestreo a través del ciclo de cultivo.



Con el fin de identificar taxones a nivel de género que mostraron diferencias en cada uno de los tratamientos a través del tiempo, se realizó un análisis discriminario lineal (LDA) con efecto de tamaño (LefSe). Este análisis se realizó para cada tratamiento a través del tiempo y para todos los tratamientos en cada tiempo de muestreo.

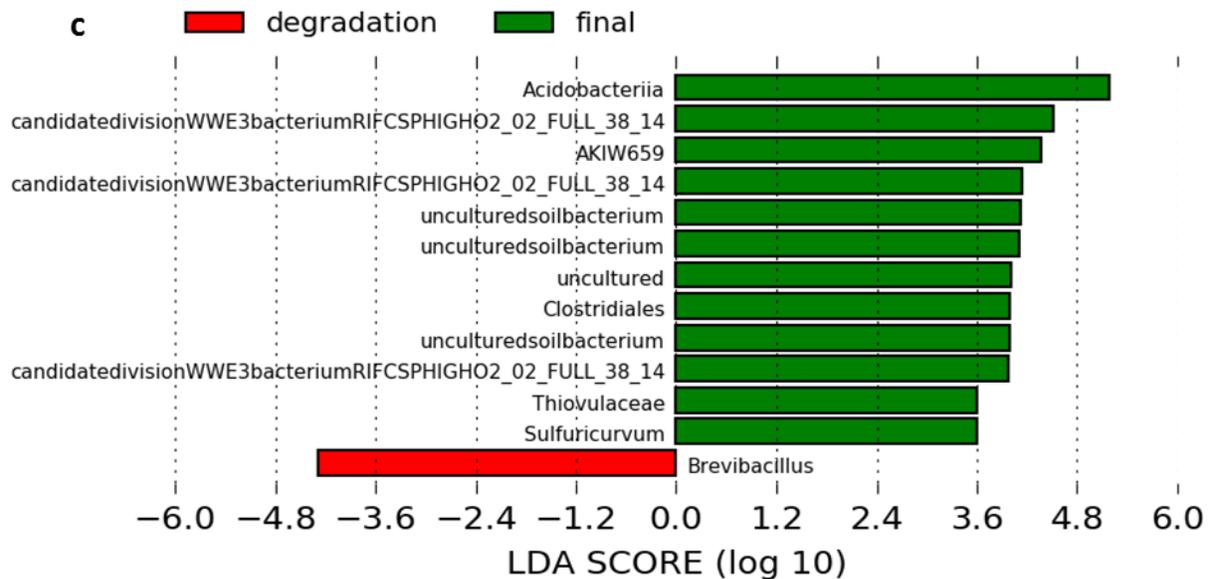
El análisis realizado para el tratamiento RS-MMO a través del tiempo permitió identificar las diferencias estadísticas entre tiempo inicial y tiempo final. Para el tiempo inicial 25 géneros como *Bryobacter*, *Polaromonas*, *Klebsiella* y *Pedomicrobium* entre otros se encontraban incrementados. En cuanto al tiempo final, 38 géneros estaban disminuidos, entre ellos *Ignavibacteria*, *Methylomonas*, *Hydrogenispora* y *Vulcanibacillus* (Figura 3-14).

**Figura 3-14:** Análisis discriminatorio lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-MMO (tamo de arroz dejado en cobertura con aplicación de inóculo microbiano), en los tres tiempos de muestreo. Se identificaron 25 géneros aumentados ( $p \leq 0.05$ ) en tiempo inicial (verde), frente a 38 géneros disminuidos en tiempo final (rojo). Para el análisis se tuvo en cuenta aquellos taxones con un LDA mayor de 2.0 o menor de 2.0.



El tratamiento RS-IMO presentó diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de degradación y tiempo final. En el tiempo final a nivel de género se logró identificar *Sulfuricurvum*; los otros taxones que presentaron diferencias significativas fueron asignados a clases como *Acidobacteriia*, ordenes como *Clostridiales*, y en su gran mayoría organismos que pertenecen a *uncultured bacterium*. En el caso de disminución significativa, esta se presentó en el tiempo de degradación en el género *Brevibacillus* (Figura 3-15).

Figura 3-15: Análisis discriminario lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-IMO (tamo de arroz con aplicación de inóculo microbiano con posterior incorporación). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tiempos de degradación y tiempo final. Para el análisis se tuvo en cuenta aquellos taxones con un LDA mayor de 2.0 o menor de -2.0.

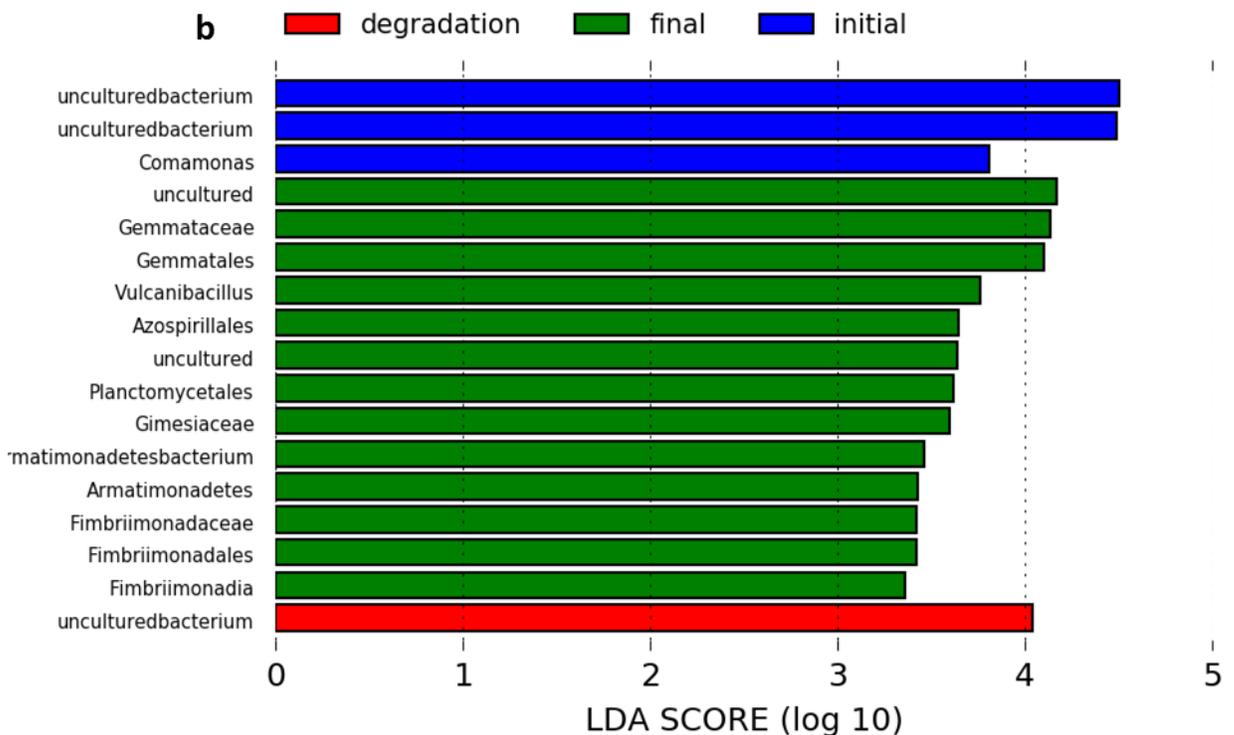


El tratamiento RS-B, presentó diferencias significativas en cada uno de los tiempos. En el tiempo inicial se identificó un aumento en el género *Comamonas*, los otros dos géneros fueron identificados como *uncultured bacterium*. Por su parte el tiempo de degradación solo presentó incrementos en un género que no pudo ser identificado (*uncultured bacterium*). Finalmente, para el último tiempo de muestreo se identificaron 13 taxones. Sin embargo, ningún microorganismo fue identificado a nivel de género, aunque fueron

asignados a ordenes como *Azospirillales*, *Planctomycetales*, *Armatimonadetes* y *Fimbriimonadales* (Figura 3-16).

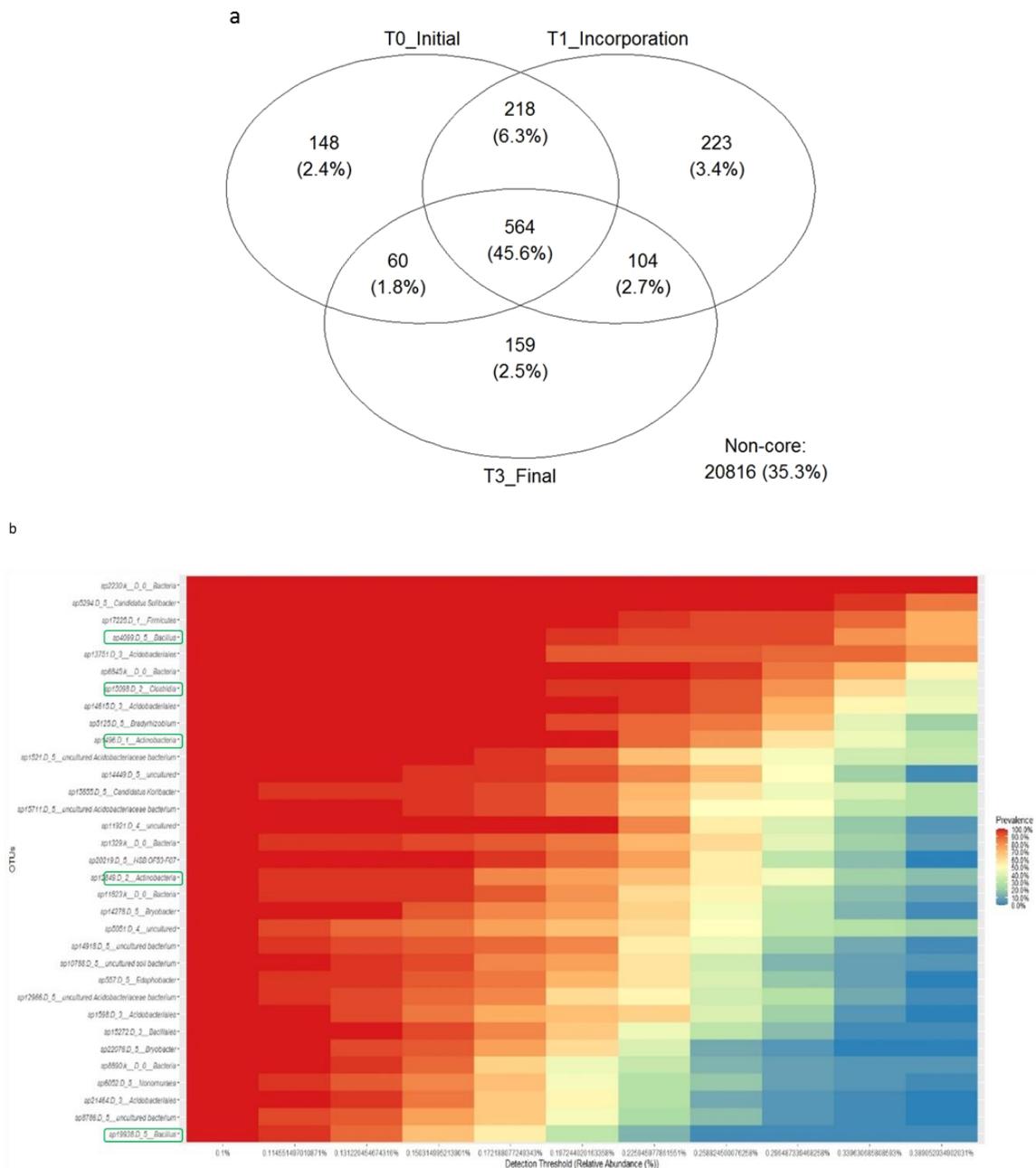
Por último, el tratamiento RS-M no presentó diferencias estadísticas significativas a nivel de género a través del tiempo. Cuando el análisis fue realizado en cada tiempo de muestreo para todos los tratamientos, no se encontró diferencia estadística significativa.

Figura 3-16: Análisis discriminario lineal con efecto del tamaño (LEfSe) para el tratamiento RS-B (tamo de arroz quemado con posterior incorporación de las cenizas). Se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos de muestreo para este tratamiento. Para el análisis se tuvo en cuenta aquellos taxones con un LDA mayor de 2.0 o menor de -2.0.



Con el fin de identificar la población que se mantuvo entre todos los tratamientos a lo largo de todos los tiempos de muestreo, se identificó el core mediante Qiime2 y R®, identificando que está compuesto por un total de 564 OTUs, donde se destacan géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces* (Figura 3-17).

**Figura 3-17:** Análisis de las comunidades que hacen parte del *core* microbioma, teniendo en cuenta una persistencia a través de todos los tratamientos y a través de todos los tiempos. (a) Diagrama de Venn. Señalando el número y porcentajes de OTUs que hacen parte de la comunidad *core*, así como los OTUs únicos de cada tiempo de muestreo. (b) Mapa de calor donde se señalan algunos de los principales microorganismos que hacen parte de la comunidad *core*.



En la búsqueda de identificar las relaciones directas o indirectas entre los taxones que coexisten entre los tratamientos (patrones de co-ocurrencia) que ayudarían a los roles funcionales o nichos ambientales ocupados por los microorganismos se desarrolló un análisis de redes de co-ocurrencia.

Es así que se identificó la topología de red (Tabla 3-2) para cada uno de los tratamientos, así como los *key taxa* o taxones claves (microorganismos altamente conectados en la red) y módulos (indicativos de procesos ecológicos que gobiernan la comunidad (Ma et al., 2020), de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. De esta manera se logró determinar para el tratamiento RS-MMO, cuatro *key taxa*, identificados como *Paenibacillus polymixa*, *Synthrophaceae (Delta-Proteobacteria)*, *Actinobacteria* y *Clostridium*. En el caso del tratamiento RS-IMO se identificó *Pedosphaeraceae*. Mientras que en el tratamiento RS-B fueron identificados *Pandoraea* y *Bacillus* como *key taxa*. Finalmente, en el tratamiento RS-M, se identificó un taxón clave perteneciente a *Sphingomonadaceae* y uno perteneciente a *Sulfuricurvum* (Anexo O).

**Tabla 3-2:** Topología de las redes asociadas a cada tratamiento de estrategia de manejo del suelo. ANOVA-Tukey ó Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$   $n = 4$ .

	RS-MMO	RS-IMO	RS-B	RS-M
Número de nodos	255	242	242	224
Número de ejes	581	432	428	401
Ejes positivos	340	248	242	208
Ejes negativos	241	184	186	193
Modularidad	0.51	0.58	0.60	0.57
Número de módulos	15	13	16	14
Promedio de grados	4.5	4.0	4.0	4.0
Coefficiente de agrupación o transividad	0.073	0.091	0.067	0.080

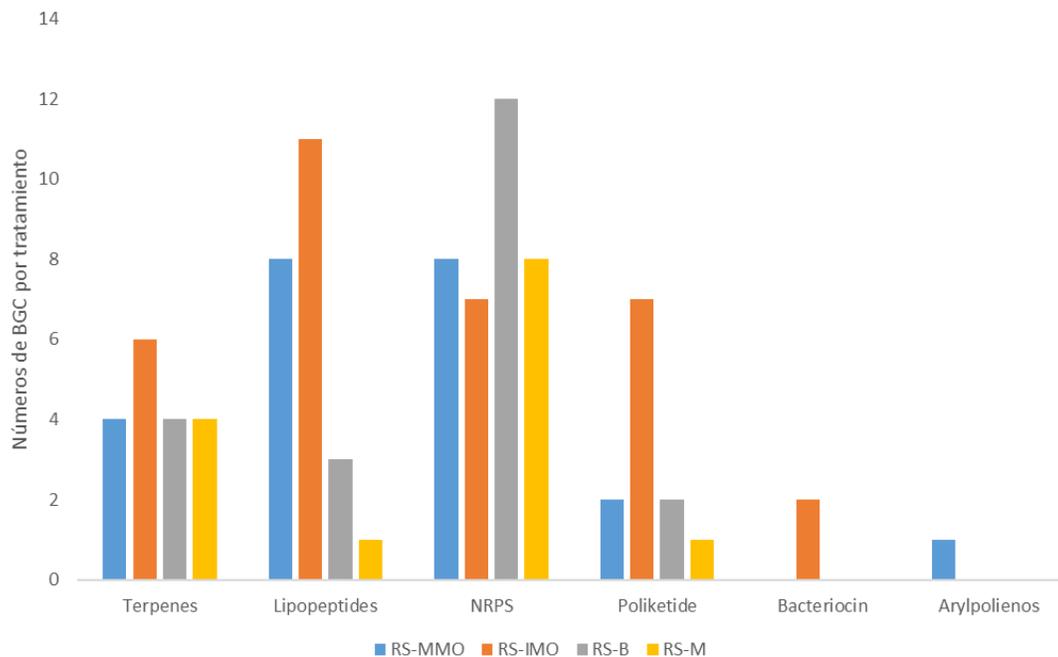
### **3.3.4 Análisis del potencial funcional a través de metagenómica de los suelos de soporte en los tiempos inicial, degradación y final**

Los datos crudos de la secuenciación arrojaron un total de 767.037.382, 741.415.123, 709.499.598 de secuencias para el tiempo inicial, degradación y final respectivamente. Tras la realización de la limpieza de las secuencias (Phred > 30) se obtuvo un total de 342.772.402, 326.043.566 y 309.638.984 secuencias finales para los tiempos inicial, degradación y final respectivamente. Los cambios en el número de secuencias luego del filtrado se presentan en el [Anexo P](#).

Los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos especializados, producidos por microorganismos y plantas. Se encuentran localizados en el genoma, usualmente codificados por genes organizados en grupos que funcionan juntos para ensamblar una molécula, conocidos como agrupamientos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) (Sharrar et al., 2020).

En la predicción de agrupamientos BGCs se emplearon todos los ensamblajes con los parámetros por defecto en el programa AntiSMASH. La recuperación de los BGC se realizó con el fin de identificar los posibles metabolitos secundarios (MS) de interés tanto ecológico como biogeoquímico. De esta manera las clases de BGCs identificadas en el estudio fueron en total 91, donde se identificaron lipopéptidos (LP), péptidos no ribosomales (NRPs), policétidos (PK), terpenos (T), Bacteriocinas (B) y Arilpolienos (AP) ([Figura 3-19](#)).

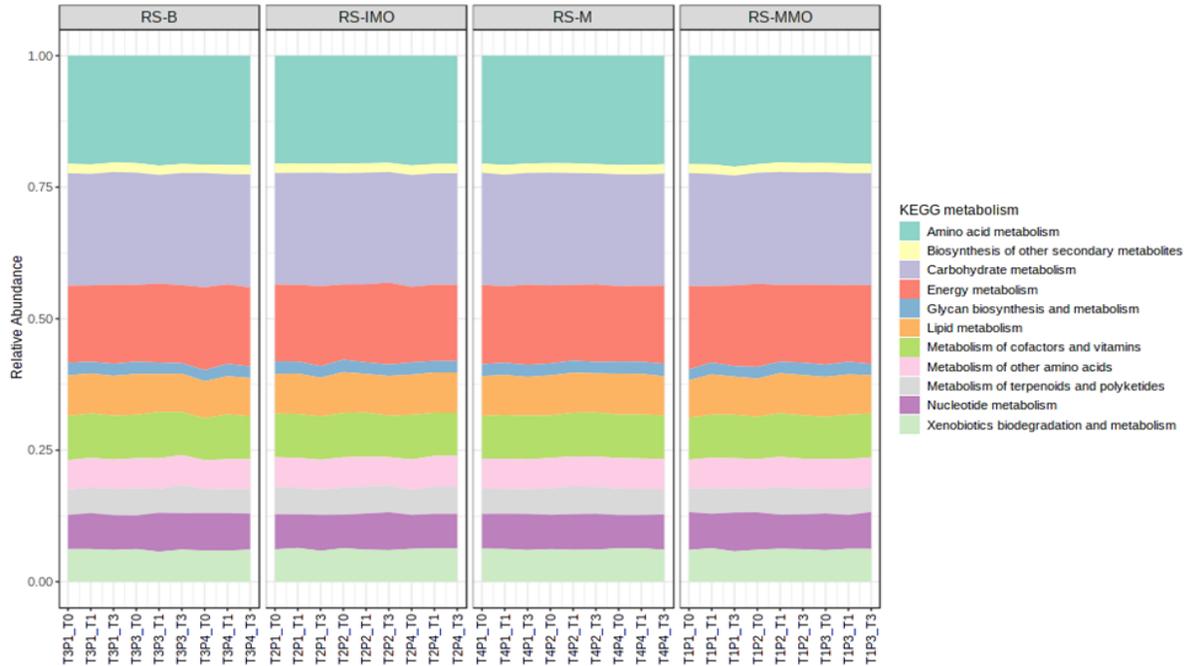
**Figura 3-18:** Agrupamientos de genes biosintéticos (BGCs) identificados en los metagenomas de suelo de soporte para cada uno de los tratamientos. NRPs: péptidos no ribosomales. RS-MMO: tamo de arroz dejado en cobertura con aplicación de inóculo microbiano con potencial degradador; RS-IMO: tamo de arroz con aplicación de inóculo microbiano con potencial degradador con posterior incorporación; RS-B: tamo de arroz quemado con posterior incorporación de las cenizas y RS-M: tamo de arroz en cobertura.



El tratamiento RS-MMO presentó los BGCs mencionados con anterioridad excepto bacteriocinas. Sin embargo, fue el único que presentó recuentos de arilpolienos. Mientras el tratamiento RS-IMO presentó el mayor número de conteos en BGCs (33) destacándose por el gran número de los lipopéptidos, adicionalmente fue el único con reporte de bacteriocinas. RS-B por su parte presentó un mayor contenido de péptidos no ribosomales y su recuento total de BGCs se asemeja al tratamiento RS-MMO. Por último, el tratamiento RS-M fue el que menos recuentos de BGC presentó (14).

En el análisis funcional del metagenoma de suelos agrícolas empleados en este estudio, se empleó la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG, por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos con KEGG, revelaron un total de 9.795 genes, asociados a metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, energía, lípidos, cofactores y vitaminas, terpenoides, policétidos, nucleótidos y otros amino ácidos, de igual forma identificó genes relacionados con metabolismo y biodegradación de compuestos xenobióticos, así como la biosíntesis de otros metabolitos secundarios (Figura 3-20).

**Figura 3-19:** Abundancia relativa de genes asociados a procesos metabólicos identificados en KEGG para cada uno de los tratamientos. Tx: tratamiento x; Px: parcela x.

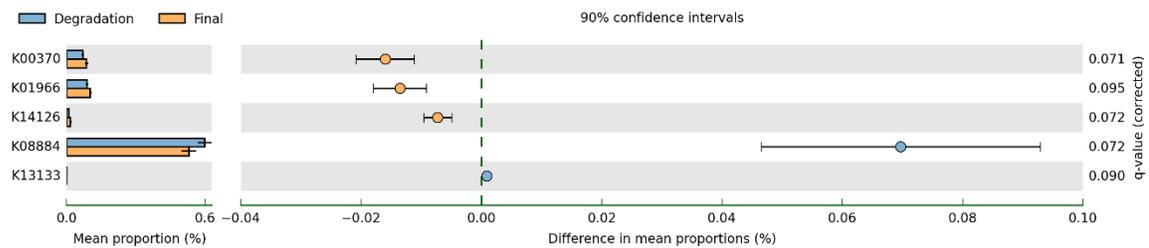


En cuanto al análisis de estos genes, la mayoría de las diferencias fueron obtenidas en tiempo final en comparación a tiempo inicial. Sin embargo, también se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tiempo de degradación y tiempo final.

Cuando se comparó tiempo inicial y final, el potencial funcional del tiempo inicial estaba involucrado en metabolismo de aminoazúcares, biosíntesis de N-glicanos, quimiotaxis y degradación de compuestos orgánicos. Por su parte el tiempo final incrementó las funciones potenciales relacionadas con procesos de DNA como reparación, así como funciones relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos ([Anexo Q](#)).

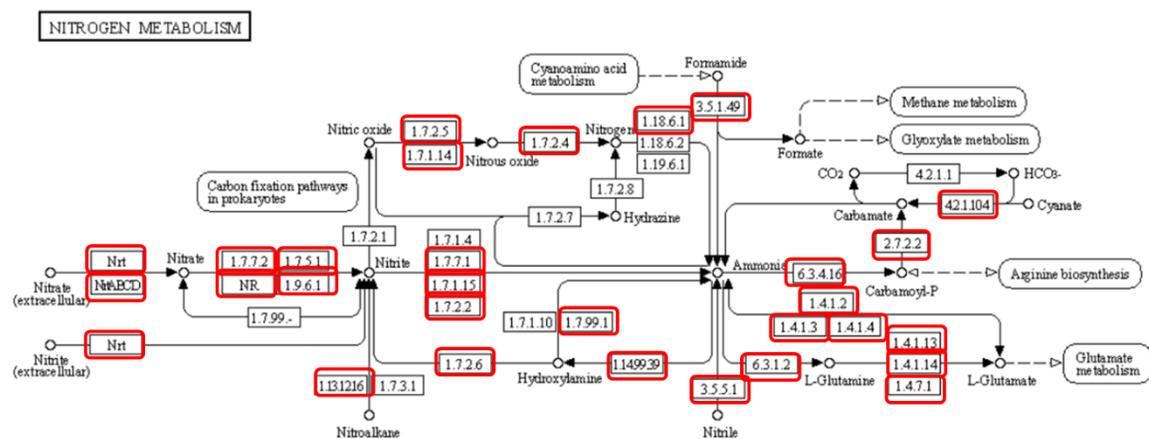
Por su parte en la comparación de tiempo de degradación con tiempo final, la función de degradación de valina, leucina e isoleucina (K01966), la nitrito reductasa (K00370) y la hidrogenasa no reductora F420 (K14126) involucrada en el metabolismo del metano se encontraban disminuidas en comparación al tiempo de degradación. Por su parte la serina/treonina proteína quinasa (K08884) y una proteína de transporte de RNA (K13133) se encontraban diferenciadas en el tiempo de degradación cuando se compararon con el tiempo final ([Figura 3-21](#)).

**Figura 3-20:** Proporción de secuencias del potencial funcional identificado con KEGG. Comparación entre los tiempos degradación y final. Se identificaron una disminución de la proporción en K00370 ( $p = 0.071$ ), K01966 ( $p = 0.095$ ), K14126 ( $p = 0.072$ ), K08884 ( $p = 0.072$ ) y K13133 ( $p = 0.090$ ).



Adicionalmente, se buscaron rutas de genes asociadas al ciclo del N. De esta manera se identificó genes asociados a la fijación de nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, reducción asimilatoria y desasimilatoria de nitrato (Figura 3-22) sin diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos.

**Figura 3-21:** Metabolismo del nitrógeno reportado en KEGG. Se señalan en recuadro rojo los identificadores EC de cada una de las enzimas involucradas en los diferentes procesos del metabolismo de nitrógeno identificadas en este estudio.

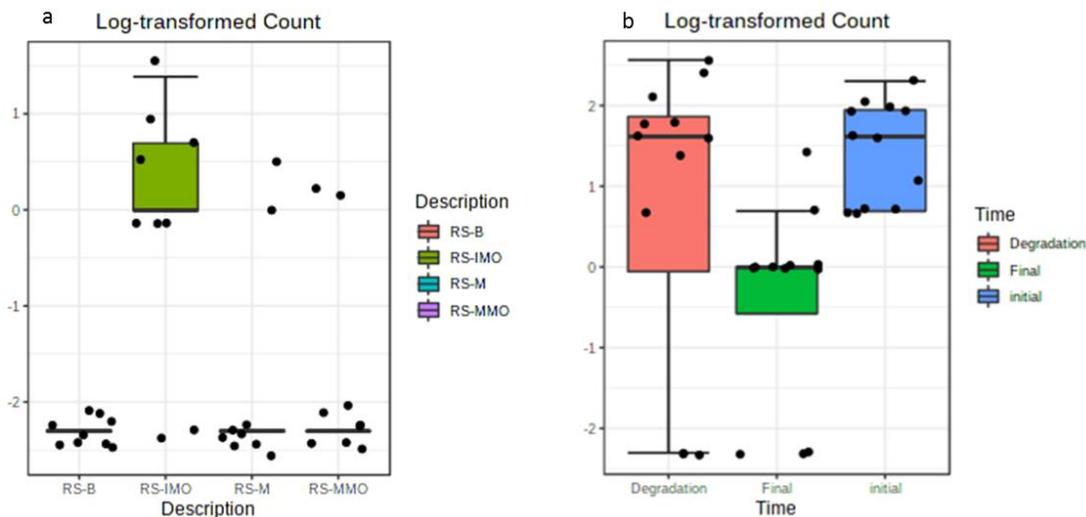


En cuanto al ciclo del C el enfoque fue dirigido hacia dos procesos, la degradación de carbono y el metabolismo del metano. El análisis funcional del proceso de degradación de carbono se realizó sobre la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZy, por sus siglas en inglés). Este análisis en particular reveló la presencia de un total de 262

familias CAZy, con una alta proporción de enzimas asociadas a las familias de las glicosil hidrolasas (GH). Se identificaron las familias de enzimas relacionados con degradación de carbohidratos a saber: 118 glicosil hidrolasas (GH), 27 polisacárido liasas (PL) y 17 carbohidrato esterases (CE). En cuanto a síntesis de carbohidratos, se detectaron 47 glicosil transferasas (GT). De igual forma se detectó un total de 41 módulos de reconocimiento para unión a carbohidratos (CBM) y 12 actividades auxiliares (AA), es decir enzimas redox que actúan en conjunto con las CAZymes.

Cuando se analizaron todos los tratamientos sin tener en cuenta el tiempo ( $n = 9$  para cada tratamiento) a través de la plataforma MicrobiomeAnalyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>), se encontró en CBM5 una mayor abundancia en el conteo de logaritmo transformado en el tratamiento RS-IMO ( $p = 0.0062$ ) frente a los otros tratamientos. Mientras que cuando se evaluaron todos los tiempos ( $n = 12$  por cada tiempo), la GH92 presentó diferencias estadísticas significativas ( $p = 0.0072$ ), donde la abundancia en el conteo del logaritmo transformado fue mayor en los tiempos inicial y degradación frente al tiempo final (Figura 3-23).

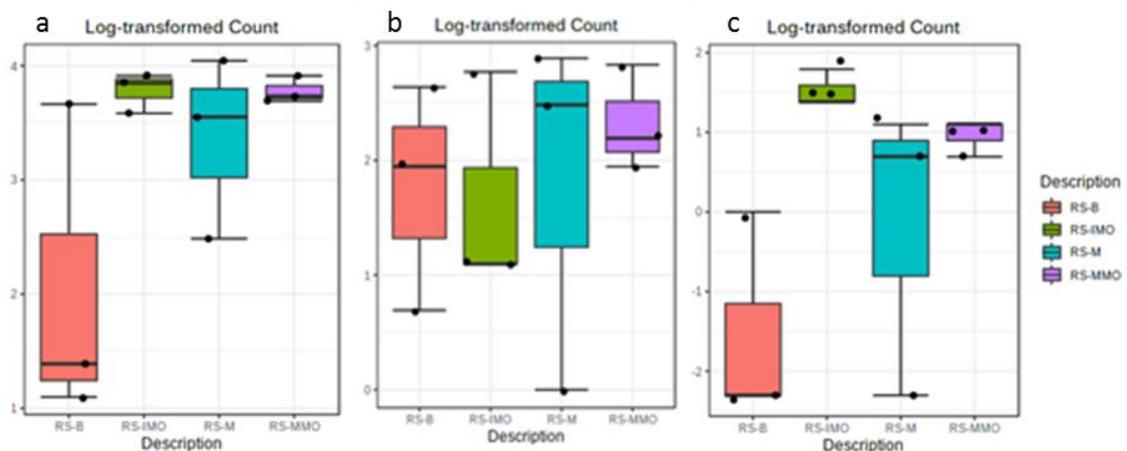
**Figura 3-22:** Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis de los tratamientos y de los tiempos. (a) Diferencias entre los tratamientos en el módulo de unión a carbohidratos CBM5 ( $p = 0.0062$ ). (b) Diferencia entre los tiempos en la familia glicosil hidrolasa GH92 ( $p = 0.0072$ ).



De igual forma se presentaron diferencias en las GH113 ( $p = 0.0080$ ), GH135 ( $p = 0.0080$ ), GH51 ( $p = 0.0222$ ) y la GH116 ( $p = 0.0382$ ) que se encontraban con una mayor abundancia en tiempo de degradación, frente a los otros dos tiempos de muestreo.

En el análisis tiempo a tiempo de los tratamientos, el único tiempo que mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos fue el tiempo de degradación en CBM2 ( $p = 0.033$ ), CE8 ( $p = 0.040$ ), GT39 ( $p = 0.040$ ) y CBM35 ( $p = 0.095$ ). En el caso de CBM2, el tratamiento RS-B se encontró con la menor abundancia en comparación a los demás tratamientos. CE8 por su parte presentó igual que el anterior una menor abundancia en el tratamiento RS-B en comparación a los demás tratamientos, mientras que RS-IMO tuvo una mayor abundancia en comparación al resto de los tratamientos. En el caso de GT39, la abundancia más baja fue para el tratamiento RS-IMO frente al resto de los tratamientos. Finalmente, el CMB35 se encontraba disminuido en los tratamientos RS-B y RS-M en comparación a los dos tratamientos restantes (Figura 3-24).

**Figura 3-23:** Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis de los tratamientos en cada uno de los tiempos. (a) Diferencias entre los tratamientos en el módulo de unión a carbohidratos CBM2 ( $p = 0.0033$ ). (b) Diferencia entre los tiempos en la familia glicosil transferasa GT39 ( $p = 0.040$ ). (c) Diferencia entre los tiempos en la familia carbohidrato esterasa CE8 ( $p = 0.040$ ).

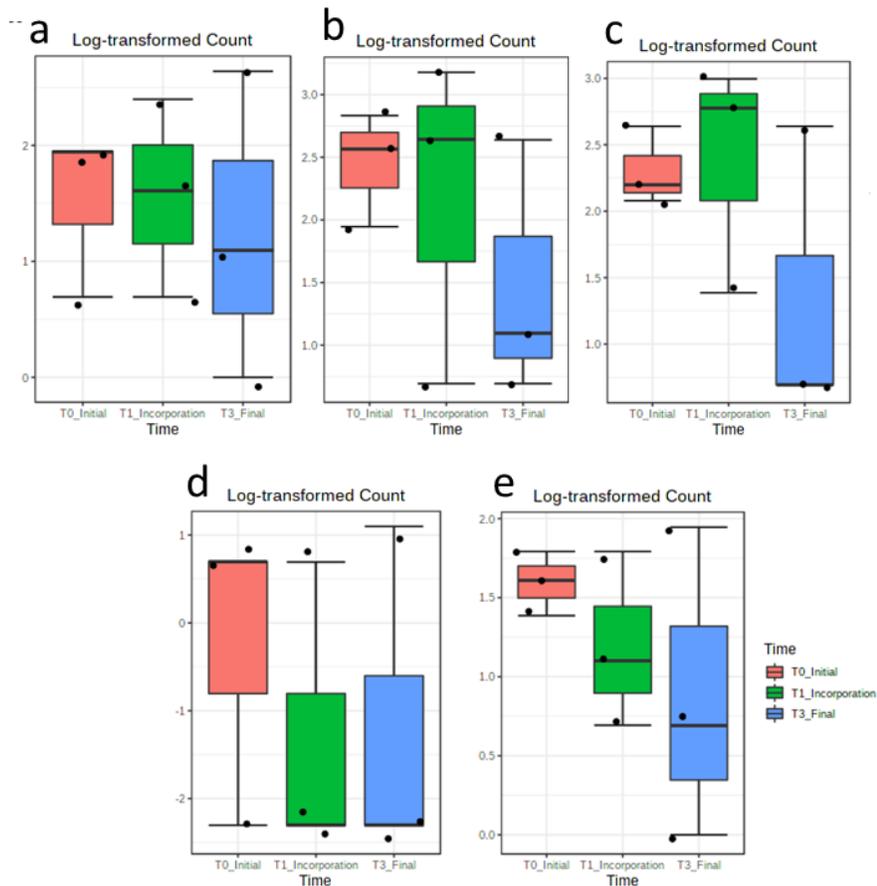


Por último, cuando se analizó cada uno de los tratamientos a través del tiempo, se encontraron diferencias estadísticas significativas. En el caso del tratamiento RS-MMO, las

diferencias se presentaron en GH130 ( $p = 0.013$ ), GH16 ( $p = 0.016$ ), GT30 ( $p = 0.04$ ), GH27 ( $p = 0.053$ ) y GH102 ( $p = 0.053$ ).

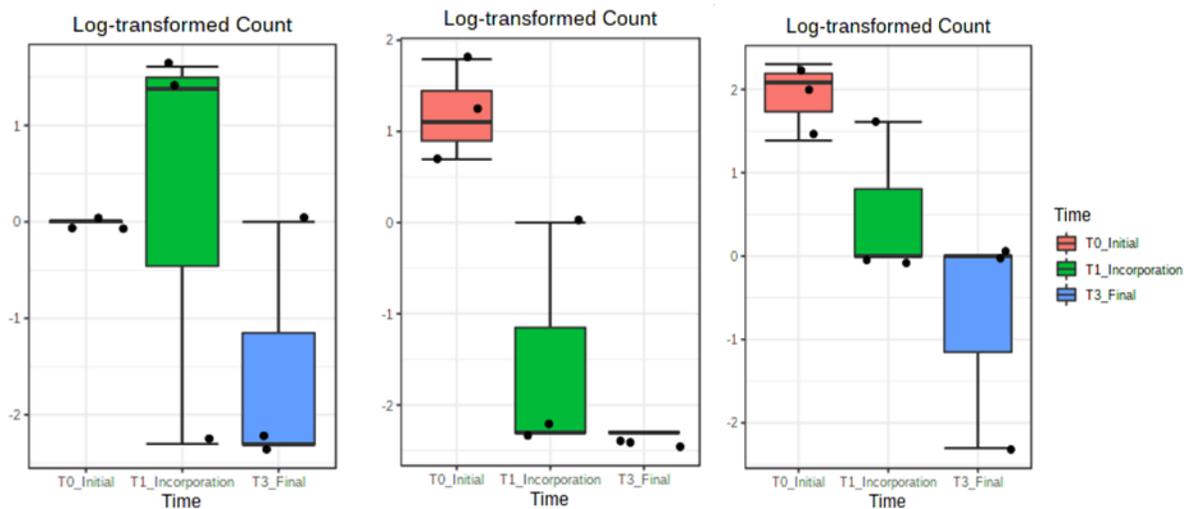
La GH130 el mayor logaritmo fue evidenciado en tiempo inicial seguido por el de incorporación y de últimas el tiempo final. Un comportamiento similar fue evidenciado para GH102, el tiempo con mayor conteo de logaritmo transformado fue el de degradación, seguido por el inicial y en último lugar el tiempo final. Mientras que para GH16 y GT30 el tiempo de incorporación presentó la mayor abundancia seguido por el tiempo inicial y en último lugar se encontró el tiempo final. Finalmente, GH27 presentó mayores abundancias en tiempo inicial en comparación los otros dos tratamientos. (Figura 3-25).

**Figura 3-24:** Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en el análisis del tratamiento RS-MMO en cada uno de los tiempos. (a) Familia GH130 ( $p = 0.013$ ). (b) Familia GH16 ( $p = 0.016$ ). (c) Familia GT30 ( $p = 0.04$ ). (d) Familia GH27 ( $p = 0.053$ ). (e) Familia GH102 ( $p = 0.053$ ).



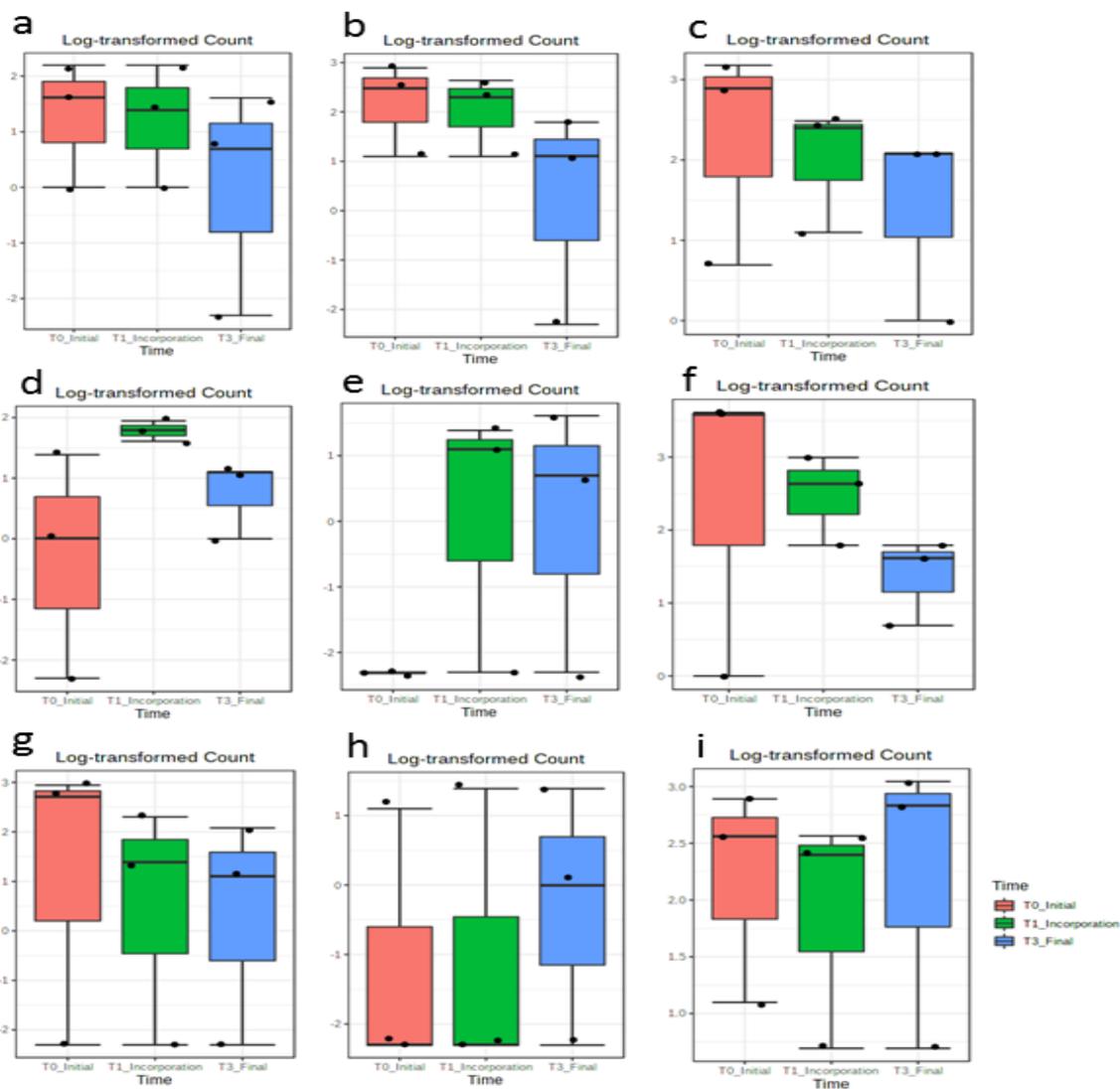
El tratamiento RS-IMO presentó diferencias estadísticas significativas en tres familias, a saber: AA12 ( $p = 0.036$ ), GH148 ( $p = 0.058$ ) y PL9 ( $p = 0.058$ ), como característica común, siempre los conteos se encontraron disminuidos en el tiempo final en comparación al tiempo inicial y de degradación. (Figura 3-26).

**Figura 3-25:** Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-IMO en cada uno de los tiempos. (a) Diferencias entre los tratamientos en la familia AA12 ( $p = 0.036$ ). (b) Diferencia entre los tiempos en la familia GH148 ( $p = 0.058$ ). (c) Diferencia entre los tiempos en la familia PL9 ( $p = 0.058$ ).



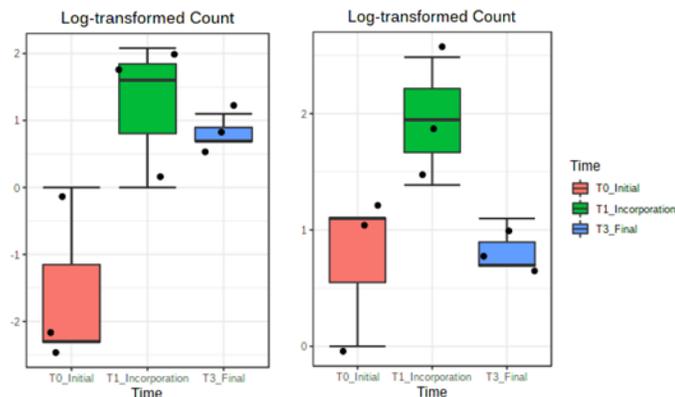
El tratamiento RS-B, por su parte fue el que mayores diferencias presentó a través del tiempo. Las diferencias se presentaron en la GT83 ( $p = 9.97E-4$ ), GH135 ( $p = 0.0032$ ), GH46 ( $p = 0.0073$ ), GT81 ( $p = 0.014$ ), GH9 ( $p = 0.014$ ), GT5 ( $p = 0.014$ ), GT35 ( $p = 0.044$ ), PL22 ( $p = 0.065$ ) y GH144 ( $p = 0.088$ ). El comportamiento varió de acuerdo con cada una de las familias identificadas. En el caso de las GH9, GH144 y GT5 se encontró un mayor conteo en los tiempos inicial y de degradación en comparación con el tiempo final. La GH135 y GH44 por su parte estaban con un mayor conteo en el tiempo de degradación en comparación a los otros dos tiempos. La GT83 y GT35 por su parte presentaron mayores conteos en tiempo inicial seguido por tiempo de degradación y en última posición el tiempo final. Finalmente, la PL22 y GT81 se encontraban con los mayores conteos en tiempo final (Figura 3-27).

**Figura 3-26:** Familias CAZy que presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-B en cada uno de los tiempos. (a) GT83 ( $p = 9.97E-4$ ). (b) GH135 ( $p = 0.0032$ ). (c) GH46 ( $p = 0.0073$ ) (d) GT81 ( $p = 0.014$ ). (e) GH9 ( $p = 0.014$ ). (f) GT5 ( $p = 0.014$ ). (g) GT35 ( $p = 0.044$ ). (h) PL22 ( $p = 0.065$ ). (i) GH144 ( $p = 0.088$ ).



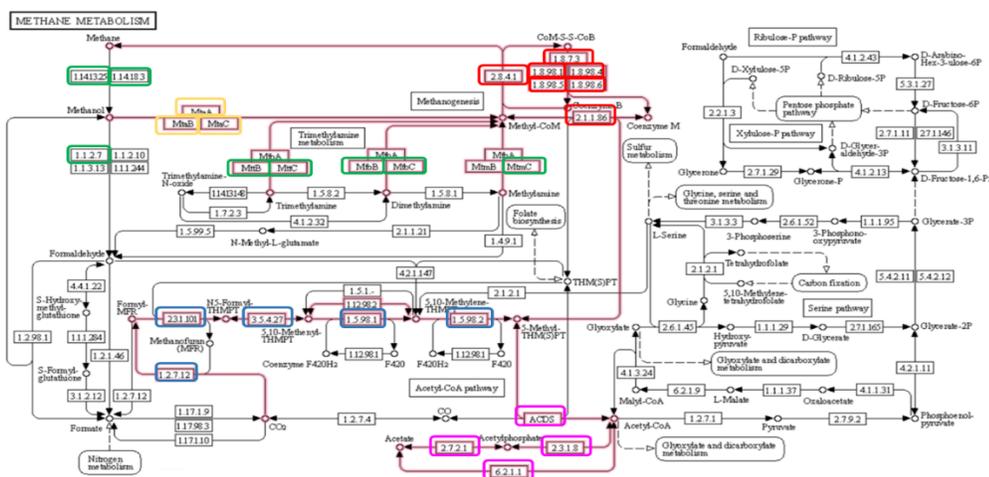
Para finalizar, el tratamiento RS-M presentó diferencias, en GH35 ( $p = 0.027$ ), con mayor conteo en tiempo de degradación, seguida por tiempo final y por último en tiempo inicial. mientras que la GH51 ( $p = 0.027$ ) al igual que la anterior presentó mayor conteo en tiempo de degradación seguida por tiempo inicial y disminución en tiempo final (Figura 3-28).

**Figura 3-27:** Familias (a) CAZy GH35 ( $p = 0.027$ ) y (b) GH51 ( $p = 0.027$ ) las cuales presentaron diferencias estadísticas significativas en los conteos de logaritmos transformados en los análisis del tratamiento RS-M en cada uno de los tiempos.



Se seleccionó el metabolismo del metano debido a que el cultivo de arroz es una de las principales fuentes antropogénicas de producción de metano, ya que el proceso de inundación del agroecosistema permite las condiciones propicias para ello. En el metabolismo del metano se identificó tanto el proceso de metanogénesis, como el de metanotrofia (Figura 3-29). Particularmente en metanogénesis se identificaron las rutas hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica.

**Figura 3-28:** Metabolismo del metano. En recuadro rojo se encuentran los identificadores EC de las enzimas identificadas en las tres rutas principales de la metanogénesis, en recuadro amarillo la metilotrófica; en azul la hidrogenotrófica; en magenta la acetoclástica y finalmente en recuadro verde, los EC comunes para todas las rutas. En recuadro verde se encuentran los identificadores EC de las enzimas identificada en la metanotrofia.



### 3.4 Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la actividad enzimáticas asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz

Con el objeto de conocer la actividad funcional de la comunidad microbiana a través del metabolismo del C, N y P, se decidió determinar la actividad enzimática en el suelo de soporte de enzimas representativas de cada uno de estos ciclos, para cada uno de los tiempos (inicial, degradación, floración y final). Adicionalmente para cada una de las actividades enzimáticas se realizó dos tipos de análisis, un análisis de todos los tratamientos en cada tiempo de muestreo y un análisis de cada tratamiento a través del tiempo, como se muestra a continuación.

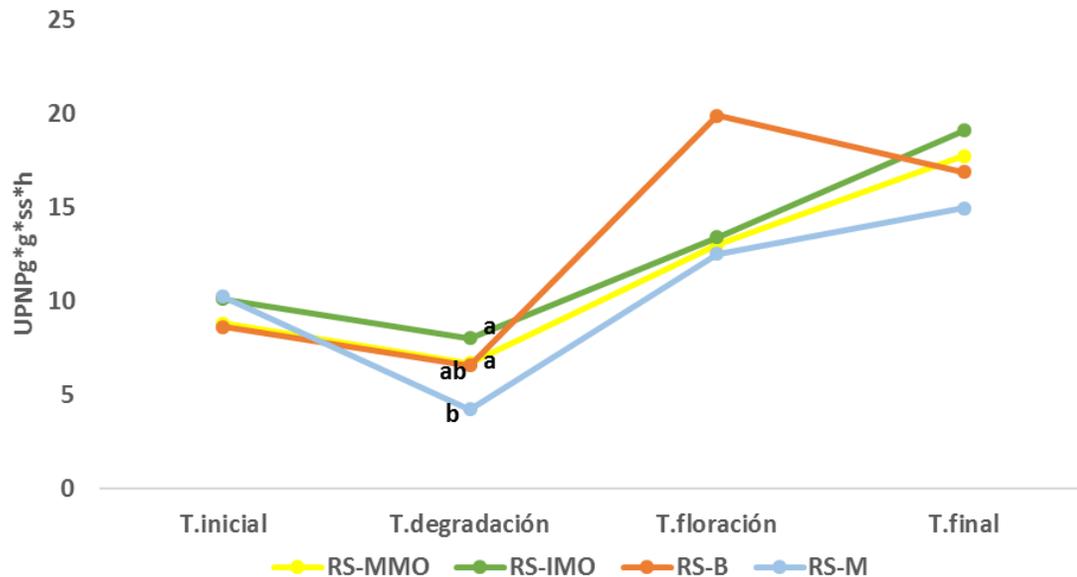
#### 3.4.1 Carbono

La degradación de residuos vegetales en suelo está determinada por la actividad celulolítica y hemicelulolítica, un proceso lento que depende de la concentración, localización y movilidad de las enzimas degradadoras de carbono (C), así como de la concentración del sustrato, pH, temperatura, contenido de agua, material vegetal, estación y tipo de manejo agrícola (Sethi et al., 2013).

Las actividades enzimáticas relacionadas al ciclo del carbono desarrolladas en este estudio consistieron en la actividad  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) y la actividad celulasa (EC 3.2.1.4). En general las enzimas asociadas a la descomposición del ciclo de C en este estudio mostraron un incremento significativo en función del tiempo.

Actividad  **$\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21)**, en el análisis de los tratamientos en cada tiempo de muestreo se evidenció una disminución de la actividad para todos los tratamientos en el tiempo de degradación, con un incremento hasta el tiempo final. Los análisis indican que solo en el tiempo de degradación se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p = 0.084$ ), en especial para el tratamiento RS-M que obtuvo el valor más bajo de la actividad enzimática (4.21 ug pNPG\*gss\*h) ([Figura 3-30](#)).

**Figura 3-29:** Evaluación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo. Prueba estadística ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.37$ ; tiempo degradación  $p = 0.084$ ; tiempo floración  $p = 0.43$ ; tiempo final  $p = 0.64$ .



El análisis de cada uno de los tratamientos a través del tiempo reflejó diferencias estadísticas para cada uno de los tratamientos, excepto para el tratamiento RS-B (Tabla 3-3).

**Tabla 3-3:** Análisis de varianza de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.004$ ; RS-IMO  $p = 0.000$ ; RS-B  $p = 0.017$ ; RS-M  $p = 0.010$

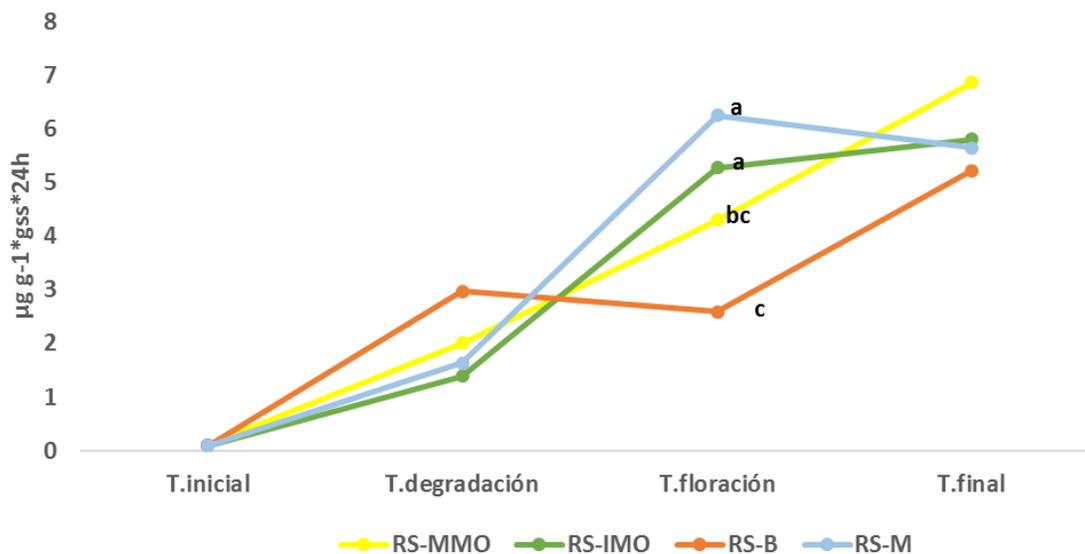
Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	8.82±0.87 c	6.69±1.26 bc	12.97±1.23 b	17.72±4.49 a
RS-IMO	10.11±1.02 bc	8.01±2.00 c	13.39±3.55 b	19.07±2.17 a
RS-B	8.61±2.32 a	6.57±2.60 a	19.88±13.07 a	16.88±4.70 a
RS-M	10.22±1.68 b	4.25±1.21 ab	12.52±3.82 a	14.94±6.11 a

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

La actividad **celulasa (EC 3.2.1.4)** evidenció un incremento en la actividad a partir del tiempo inicial y hasta el tiempo final. Los análisis indican que se presentaron diferencias

estadísticas significativas en el tiempo de floración entre los tratamientos ( $p = 0.009$ ), donde los tratamientos RS-IMO y RS-M presentaron los mayores valores de la actividad enzimática (Figura 3-31).

**Figura 3-30:** Evaluación de la actividad celulasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.93$ ; tiempo degradación  $p = 0.40$ ; tiempo de floración  $p = 0.00$ ; tiempo final  $p = 0.71$



Al analizar cada tratamiento a través del tiempo se encontró que el tratamiento RS-MMO presentó un incremento constante a través del tiempo. Los tratamientos RS-IMO y RS-M tuvieron el mismo comportamiento, un ligero aumento en el tiempo de degradación y alcanzaron el máximo valor de actividad celulasa en el tiempo de floración. Mientras que el tratamiento RS-B presentó mayores fluctuaciones a través del tiempo teniendo una caída en la actividad en el tiempo de floración e incrementando la actividad para tiempo final (Tabla 3-4).

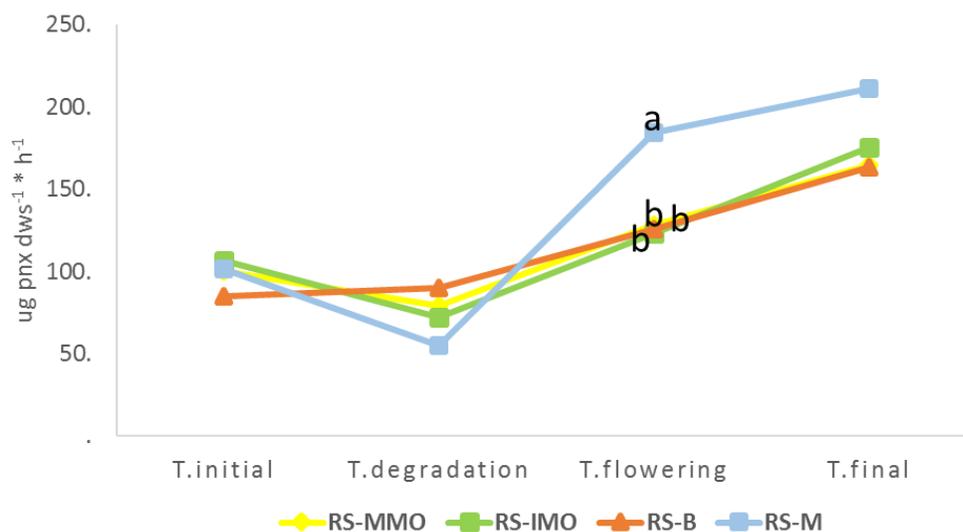
**Tabla 3-4:** Análisis de varianza de la actividad celulasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.003$ ; RS-IMO  $p = 0.001$ ; RS-B  $p = 0.022$ ; RS-M  $p = 0.000$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	0.11±0.01 c	2.01±1.04 b	4.29±1.06 a	6.86±4.93 a
RS-IMO	0.10±0.02 b	1.38±0.57 b	5.27±1.70 a	5.80±2.91 a
RS-B	0.10±0.03 b	2.97±1.52 a	2.59±1.43 a	5.22±3.04 a
RS-M	0.09±0.02 b	1.63±0.43 b	6.25±0.49 a	5.64±3.57 a

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

Los resultados para la enzima **β-xilosidasa (EC 3.2.1.37)** mostraron un comportamiento similar al de la enzima β-glucosidasa, es decir una disminución de la actividad en el tiempo de degradación con posterior incremento. Cuando se analizaron los tratamientos en cada uno de los tiempos, se observó diferencia estadística significativa en el tiempo de floración ( $p = 0.002$ ), en el que el tratamiento RS-M presentó el valor más alto de la actividad (184.39 ugPNX\*g ss\*h) (Figura 3-32).

**Figura 3-31:** Evaluación de la actividad β-xilosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo para los tratamientos. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.27$ ; tiempo degradación  $p = 0.30$ ; tiempo de floración  $p = 0.00$ ; tiempo final  $p = 0.33$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas.



Cuando se analizaron cada uno de los tratamientos a través del tiempo, se destaca el tratamiento RS-M, que disminuyó drásticamente en el tiempo de degradación, posteriormente incrementó nuevamente de manera drástica en el tiempo de floración e incrementó nuevamente en el tiempo final. Los otros tratamientos siguieron un comportamiento similar mostrando diferencias estadísticas significativas entre punto inicial y el tiempo final del ensayo, aunque sin fluctuaciones tan marcadas (Tabla 3-5).

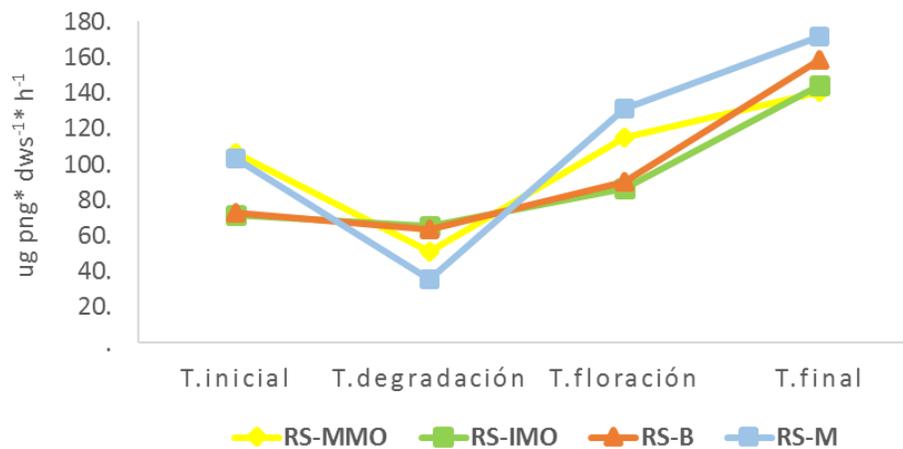
**Tabla 3-5:** Análisis de varianza de la actividad  $\beta$ -xilosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.006$ ; RS-IMO  $p = 0.003$ ; RS-B  $p = 0.004$ ; RS-M  $p = 0.000$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	99.92±21.67 <b>b</b>	78.87±20.14 <b>b</b>	127.90±8.94 <b>ab</b>	164.58±47.97 <b>a</b>
RS-IMO	106.60±9.74 <b>b</b>	71.94±30.88 <b>c</b>	123.20±22.68 <b>b</b>	175.55±47.88 <b>a</b>
RS-B	85.03±14.44 <b>b</b>	89.94±24.13 <b>b</b>	125.37±22.74 <b>ab</b>	163.09±38.13 <b>a</b>
RS-M	101.30±13.05 <b>b</b>	55.03±24.59 <b>c</b>	184.39±22.86 <b>b</b>	210.98±18.40 <b>a</b>

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

La última enzima del ciclo de carbono evaluada correspondió a  **$\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23)**, que no presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo, el comportamiento fue similar a las enzimas como  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa; es decir, se presentó disminución de la actividad en el tiempo de degradación con incremento gradual hasta el tiempo final del ensayo (Figura 3-33).

**Figura 3-32:** Evaluación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Tiempo inicial  $p = 0.21$ ; tiempo degradación  $p = 0.23$ ; tiempo de floración  $p = 0.81$ ; tiempo final  $p = 0.44$ .



Cuando este análisis se llevó a cabo para cada tratamiento a través del tiempo, se determinó que el tratamiento RS-M fue el que a pesar de que presentó la más baja actividad en tiempo de degradación terminó presentado los valores más altos en tiempo de floración y tiempo final. Sin embargo, todos los tratamientos con excepción de RS-B mostraron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo (Tabla 3-6).

**Tabla 3-6:** Análisis de varianza de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.031$ ; RS-IMO  $p = 0.019$ ; RS-B  $p = 0.004$ ; RS-M  $p = 0.014$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	106.19±36.69 ab	50.85±14.52 b	114.80±61.05 ab	140.36±14.73 a
RS-IMO	71.26±20.97 b	65.14±17.60 b	86.56±7.70b	144.31±44.03 a
RS-B	72.81±9.63 b	63.31±9.63 b	89.85±41.79 b	158.66±34.68 b
RS-M	103.34±88.75 ab	35.57±20.30 b	131.28±88.75 a	171.37±2.95 a

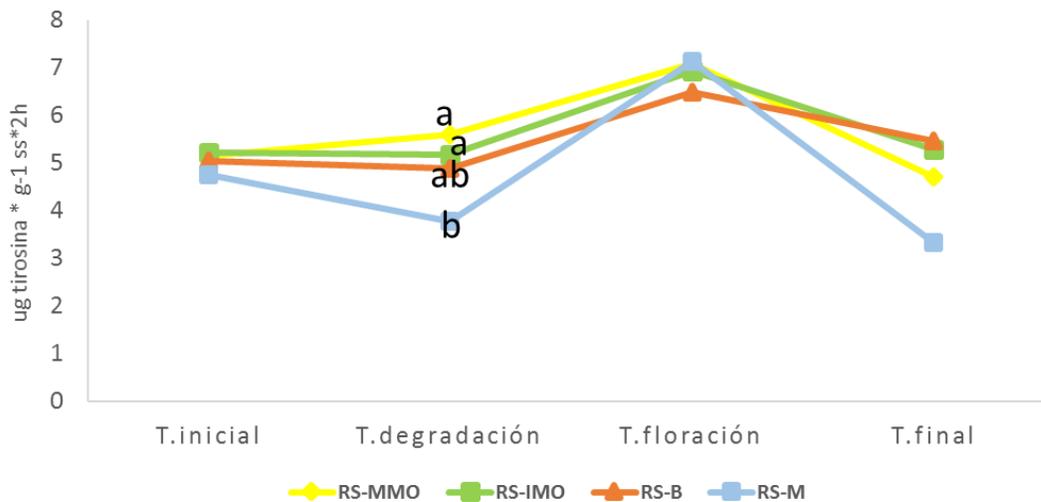
Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

### 3.4.2 Nitrógeno

Cerca del 90% del N asociado a la superficie terrestre es de origen orgánico, el cual es mineralizado en el suelo generando formas orgánicas (i.e. amino ácidos, amino azúcares) e inorgánicas ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ), de fácil asimilación para las plantas (Li et al., 2014).

La primera enzima analizada de las pertenecientes al ciclo del nitrógeno fue la **proteasa**. El análisis de los tratamientos en cada uno de los tiempos para esta enzima permitió identificar diferencias estadísticas significativas en el tiempo de degradación. Se diferenció el tratamiento RS-MMO y RS-IMO con valores significativamente altos separándolos del tratamiento RS-M, que registró la actividad enzimática más baja. Es importante aclarar que, en el tiempo de degradación, los tratamientos inoculados con microorganismos fueron los que presentaron una mayor actividad de la enzima que se incrementó levemente hasta el tiempo de floración (Figura 3-34).

**Figura 3-33:** Evaluación de la actividad proteasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.90$ ; tiempo degradación  $p = 0.07$ ; tiempo de floración  $p = 0.91$ ; tiempo final  $p = 0.42$ .



Al momento de analizar cada uno de los tratamientos a través del tiempo el único con diferencias estadísticas significativa fue el tratamiento RS-M. Este tratamiento presentó una disminución en el tiempo de degradación, en el siguiente tiempo de muestreo incrementó su actividad y finalmente cayó de manera drástica en su actividad a tiempo final (Tabla 3-7).

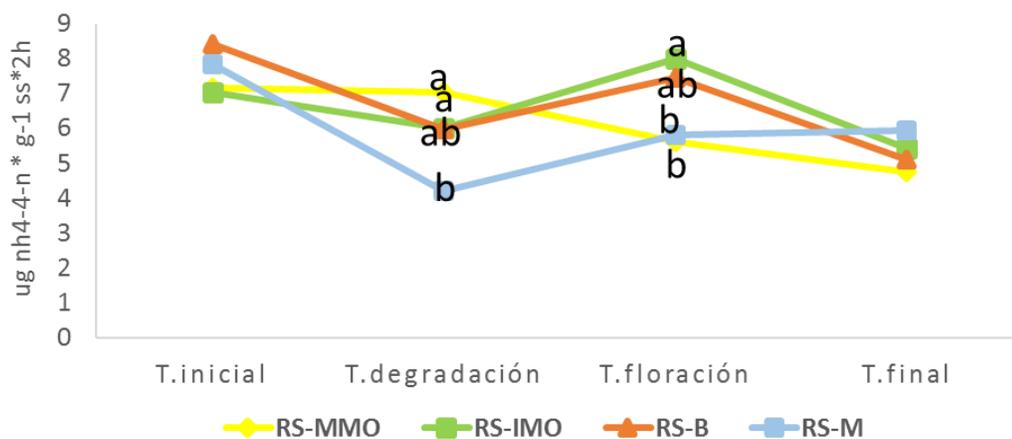
**Tabla 3-7:** Análisis de varianza de la enzima proteasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.147$ ; RS-IMO  $p = 0.414$ ; RS-B  $p = 0.630$ ; RS-M  $p = 0.000$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	5.15±0.83 a	5.58±1.56 a	7.08±1.7 a	4.70±1.11 a
RS-IMO	5.20±0.64 a	5.87±2.06 a	6.93±1.07 a	5.29±2.00 a
RS-B	5.04±0.96 a	4.88±0.55 a	6.47±1.81 a	5.46±3.05 a
RS-M	4.75±1.29 b	3.77±0.64 bc	7.13±0.8 a	3.32±0.75 c

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

La segunda enzima de interés del ciclo del nitrógeno fue la **ureasa (EC 3.5.1.5)**. En el análisis tiempo a tiempo de los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas en los tiempos degradación y floración. En el tiempo de degradación se evidencia una disminución marcada en actividad enzimática para el tratamiento RS-M que lo diferenció de los tratamientos con aplicación de MO. En el tiempo de floración se evidencia una marcada distinción en los niveles de la actividad de la enzima entre el tratamiento RS-IMO de los otros tratamientos donde se aplicó el TA en cobertura (Figura 3-35).

**Figura 3-34:** Evaluación de la actividad ureasa en cada uno de los tiempos de muestreo para los tratamientos. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.76$ ; tiempo degradación  $p = 0.03$ ; tiempo de floración  $p = 0.02$ ; tiempo final  $p = 0.37$ .



Cuando se realizó el análisis de cada uno de los tratamientos a través del tiempo no se presentaron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos. Los tratamientos RS-MMO y RS-B mantuvieron constante la actividad ureasa a través del tiempo sin presentar diferencias estadísticas significativas a través del tiempo. Vale la pena mencionar que a partir del primer tiempo de muestreo los tratamientos RS-IMO y RS-B presentaron un comportamiento similar a través del tiempo en valores absolutos de la actividad.

Por otra parte, el tratamiento RS-IMO presentó un incremento estadísticamente significativo en la actividad de la enzima en el tiempo de floración frente a los tiempos de degradación y final, incluso superando los valores absolutos iniciales de la actividad enzimática. En el caso del tratamiento RS-M disminuyó drásticamente y de manera estadísticamente significativa en el tiempo de degradación y a pesar de incrementar posteriormente los valores absolutos de la actividad enzimática, no alcanzó a tener los mismos valores de la misma actividad enzimática inicial ([Tabla 3-8](#)).

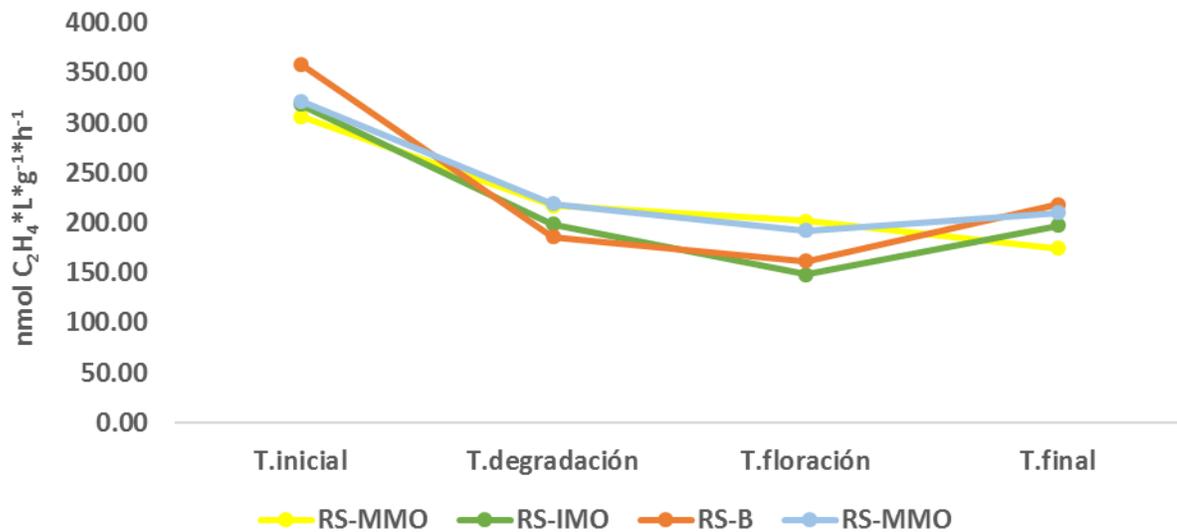
**Tabla 3-8:** Actividad de la enzima ureasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.215$ ; RS-IMO  $p = 0.009$ ; RS-B  $p = 0.064$ ; RS-M  $p = 0.002$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas.

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	7.16±2.17 a	7.03±2.72 a	5.61±1.60 a	4.75±0.55 a
RS-IMO	7.04±1.66 ab	5.98±0.64 b	7.97±1.00 a	5.40±0.78 b
RS-B	8.41±2.57 a	5.97±1.74 a	7.44±0.23 a	5.10±1.14 a
RS-M	7.82±1.20 a	4.19±0.33 b	5.79±1.046 b	5.92±1.12 b

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

La última actividad enzimática analizada para el ciclo del nitrógeno fue la **nitrogenasa (EC 1.18.2.1)**. La comparación entre tratamientos en cada punto de muestreo no identificó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ([Figura 3-36](#)).

**Figura 3-35:** Evaluación de la actividad nitrogenasa en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Tiempo inicial  $p = 0.46$ ; tiempo degradación  $p = 0.82$ ; tiempo de floración  $p = 0.32$ ; tiempo final  $p = 0.19$ .



Caso contrario se presentó cuando se analizó cada tratamiento a través del tiempo. En general se observa una tendencia de disminución de la actividad de la enzima para todos los tratamientos en los tiempos de degradación y floración manteniendo luego estable su actividad hacia el tiempo final de muestreo (Tabla 3-9).

**Tabla 3-9:** Actividad de la enzima nitrogenasa de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.003$ ; RS-IMO  $p = 0.003$ ; RS-B  $p = 0.000$ ; RS-M  $p = 0.002$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	306.34±48.66 a	217.17±37.86 b	201.96±33.13 b	174.46±41.12 b
RS-IMO	318.28±50.81 a	198.58±43.14 b	148.23±43.14 b	197.63±12.77 b
RS-B	358.70±44.52 a	185.71±21.38 bc	161.45±25.49 c	218.62±27.59 b
RS-M	321.79±46.24 a	219.33±74.77 b	192.34±66.80 b	210.30±25.33 ab

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

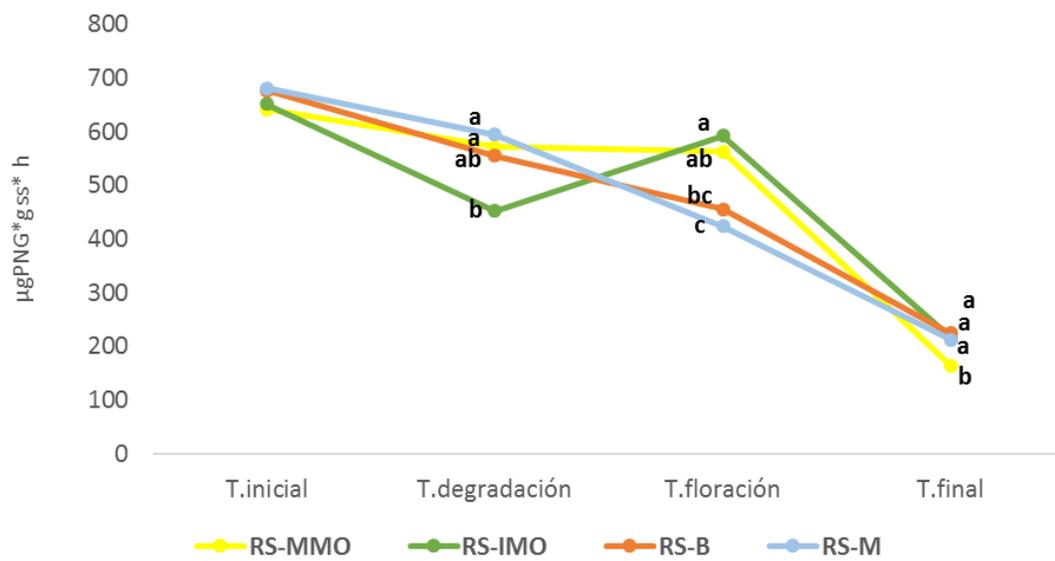
### 3.4.3 Fósforo

El fósforo orgánico representa una gran fracción del P en el suelo siendo esta una fuente importante de P para la planta, la cual está disponible en función del proceso de mineralización microbiana que se da en el suelo. En este contexto los organismos participan del proceso de mineralización a través del ciclaje de P mediante la excreción de enzimas extracelulares como fosfatasas ácidas y alcalinas que convierten el fósforo orgánico en fosfato a través del rompimiento de enlaces éster fosfato (Tarafdar et al., 2001).

Las actividades enzimáticas de ciclo del P evaluadas incluyeron la actividad fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. En general la enzima fosfatasa ácida en este estudio mostró una disminución significativa en función del tiempo. Por su parte la fosfatasa alcalina presentó un incremento en la actividad desde el tiempo inicial al tiempo de degradación, sin embargo, en los dos últimos tiempos se presenta una leve disminución de la actividad.

La actividad enzimática de la enzima **fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2)**, al ser analizada tiempo a tiempo, señaló diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para el tiempo de degradación, floración y final. Esta actividad presentó una alta actividad enzimática en el tiempo inicial que disminuyó de manera gradual en el tiempo. Es importante recalcar que para el tiempo de degradación el tratamiento RS-IMO presentó la actividad enzimática más baja; sin embargo, este presentó la actividad más alta en tiempo de floración. En el tiempo final a pesar de que la actividad disminuyó, los tratamientos RS-IMO, RS-M y RS-B se diferenciaron del tratamiento RS-MMO (**Figura 3-37**).

**Figura 3-36:** Evaluación de la actividad fosfatasa ácida en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.88$ ; tiempo degradación  $p = 0.01$ ; tiempo de floración  $p = 0.08$ ; tiempo final  $p = 0.03$ .



En cuanto al comportamiento de cada uno de los tratamientos a través del tiempo, se evidenció que el tratamiento RS-MMO mantuvo la actividad más o menos constante hasta tiempo de floración para disminuir drásticamente en el tiempo final. El tratamiento RS-IMO presentó resultados estadísticamente significativos más bajos en la actividad, hacia el tiempo de degradación, posteriormente un incremento en el tiempo de floración y finalmente disminuyó en el tiempo final. Los tratamientos RS-B y RS-M presentaron un comportamiento similar en el tiempo, en el cual disminuyeron gradualmente en cada uno de los tiempos (Tabla 3-10). Todos los tratamientos disminuyeron significativamente en el tiempo.

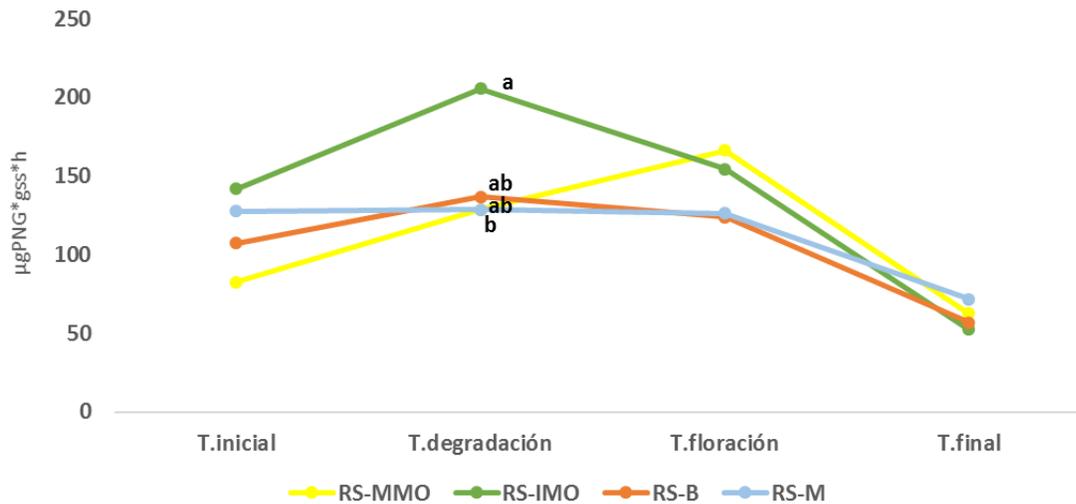
**Tabla 3-10:** Actividad de la enzima fosfatasa ácida de cada uno de los tratamientos a través del tiempo ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.016$ ; RS-IMO  $p = 0.009$ ; RS-B  $p = 0.005$ ; RS-M  $p = 0.004$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	641.52±58.47 a	571.89±56.57 a	562.71±84.71a	164.57±10.71b
RS-IMO	651.82±97.99 a	452.47±48.99 ab	592.69±147.15 b	216.95±38.51 c
RS-B	676.63±98.28 a	555.83±50.93 a	455.29±5.07 b	224.82±26.54 c
RS-M	680.75±64.86 a	594.52±61.91 ab	423.56±68.07 b	213.15±25.52 c

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

Otra de las actividades enzimáticas del ciclo del fósforo evaluada fue la **fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)**. Su actividad es más baja en comparación a la fosfatasa ácida. El tiempo de degradación fue el único donde se presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Esto sucedió a expensas del tratamiento RS-IMO, que presentó la actividad enzimática más alta a diferencia del tratamiento RS-M con la actividad más baja (Figura 3-38).

**Figura 3-37:** Evaluación de la actividad fosfatasa alcalina en cada uno de los tiempos de muestreo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas. Tiempo inicial  $p = 0.15$ ; tiempo de degradación  $p = 0.05$ ; tiempo de floración  $p = 0.35$ ; tiempo final  $p = 0.78$ .



En el análisis de los tratamientos a través del tiempo, la tendencia general de esta enzima fue a mantener una actividad enzimática a través del tiempo en cada uno de los tratamientos desde el tiempo inicial hasta el tiempo de floración, posteriormente se presentó la disminución de la actividad (Tabla 3-11).

**Tabla 3-11:** Actividad fosfatasa alcalina de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. ANOVA-Duncan / Kruskal-Wallis-Dunn  $p \leq 0.1$ . RS-MMO  $p = 0.012$ ; RS-IMO  $p = 0.002$ ; RS-B  $p = 0.049$ ; RS-M  $p = 0.009$ .

Tratamientos	T. inicial	T. degradación	T. floración	T. final
RS-MMO	82.73±27.35 <b>b</b>	128.80±41.35 <b>ab</b>	166.45±56.18 <b>a</b>	62.70±24.91 <b>b</b>
RS-IMO	141.96±32.49 <b>ab</b>	205.85±64.14 <b>a</b>	154.44±39.23 <b>a</b>	52.46±27.42 <b>b</b>
RS-B	107.45±46.96 <b>a</b>	136.75±30.30 <b>a</b>	123.85±43.86 <b>a</b>	56.71±23.84 <b>b</b>
RS-M	127.71±31.25 <b>ab</b>	110.65±10.12 <b>a</b>	126.46±17.49 <b>ab</b>	71.87±20.49 <b>b</b>

Diferentes letras, muestran diferencias estadísticas significativas en términos de tiempo de muestreo.

### 3.5 Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz

Con el objeto de evaluar la abundancia de genes indicadores de la actividad funcional de la comunidad microbiana a través del metabolismo del C, N y P, se decidió evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana de cada uno de estos ciclos, para los tiempos inicial, degradación, y final, donde se realizó un análisis de todos los tratamientos en cada tiempo de muestreo y un análisis de cada tratamiento a través del tiempo, como se muestra a continuación.

#### 3.5.1 Diseño y evaluación de cebadores

La primera tarea para dar cumplimiento a este objetivo consistió en seleccionar los genes de los ciclos biogeoquímicos de C, N, y P que sirvieran como marcadores de la participación de la comunidad microbiana durante los diferentes momentos de muestreo del ciclo del arroz. Estos genes se seleccionaron de acuerdo con su relevancia en cada uno de los ciclos.

El interés principal fue identificar cambios en la degradación potencial de C en muestras de suelo de cultivo de arroz bajo estudio. Para esto se identificaron genes que codifican para enzimas relacionadas con degradación de C (Glicosil Hidrolasas-GH), con particular interés en la enzima  $\beta$ -glucosidasa (GH3). De esta manera se realizó un alineamiento de secuencias de proteínas disponibles en el NCBI, el cual mostró dos bloques conservados en el programa jCODEHOP, generando cerca de ocho parejas de cebadores degenerados

para la identificación de este gen. Estos cebadores fueron probados con la herramienta de *euofins genomics* (<https://euofinsgenomics.eu>) y ThermoFisher Scientific® ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)) para encontrar la mejor pareja de cebadores teniendo en cuenta que la temperatura de *melting* no fuera mayor a 2°C entre ellos y que fuera menos probable que se formaran dímeros de cebadores. De esta manera se seleccionó una de las parejas de cebadores que podría resultar en un amplicon de cerca de 230 pb. Sin embargo, no generó amplificaciones a partir de las muestras de suelo empleadas, por lo cual no fue seleccionado para los ensayos posteriores.

En cuanto a los otros procesos del ciclo del C, a partir de las muestras de suelo de arroz se amplificaron con cebadores específicos los genes *mcrA*, *pmoA*, *Cel*, y GH6, (**tabla 2.1; Anexo B**), para obtener un fragmento de PCR amplificado del tamaño de pares de bases esperado a saber, *mcrA* (509 pb), *pmoA* (491 pb), *Cel* (100 pb), y GH6 (150 pb).

Posteriormente se realizó la clonación de cada uno de los fragmentos obtenidos del tamaño esperado en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y vector pCR™2.1-TOPO (TOPO®-TA cloning® kit) con el fin de identificar una clonación exitosa se empleó medio de cultivo LB suplementados con ampicilina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), Isopropyl  $\beta$ - d-1-thiogalactopyranoside - IPTG (100 mM) y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside - X-gal (40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como control se utilizó PUC19 y PHC60 sembrados en LB suplementado con IPTG, X-gal y kanamicina (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) o tetraciclina (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las clonaciones exitosas fueron secuenciadas; sin embargo, solo se logró identificar de manera correcta el clon del gen *Cel*.

En cuanto al ciclo del P, el resultado fue similar al anterior, es decir, se amplificaron las secuencias de los genes de interés a partir de las muestras de suelo. Se recuperaron los clones y en el proceso de secuenciación, las secuencias de todos los clones obtenidos para el gen *BPP* (160-200 pb), identificaron una parte de la secuencia como gen *BPP* y otra parte de la secuencia como gen *nifH*. En cuanto al gen *ALPS* (400 pb), se obtuvo un total de 5 clones, a los cuales no se les pudo secuenciar para confirmar su identidad, o realizar la curva estándar debido a las restricciones generadas por la pandemia, lo que limitó el acceso a la Universidad Nacional de Colombia.

Por último, en cuanto al ciclo del N, los genes *nifH* (450 pb), *amoA* de bacterias (491 pb) y arqueas (624 pb), *nirK* (468-514 pb), *nosZ* (259 pb), *qnorB* (389pb), *narG* (110-173 pb) y *ureC* (317 pb), fueron amplificados a partir de las muestras de suelo. Sin embargo, la secuenciación de los clones obtenidos permitió identificar de manera correcta los genes *amoA* de bacterias, *amoA* de arqueas y *nifH*, los cuales fueron confirmados mediante secuenciación del gen y sus secuencias depositadas en el NCBI.

### 3.5.2 Estandarización por qPCR de los genes *amoA* (bacterias/arqueas) y *nifH* y curvas de calibración

Las condiciones para la amplificación de los genes de estudio seleccionados *amoA* de bacterias y arqueas y *nifH* en los suelos de estudio fueron estandarizadas con réplicas de las muestras por PCR cuantitativa en tiempo real, con el kit LightCycler® 480 SYBR Green en el equipo LightCycler® 480 (Roche).

Para el gen *amoA* de bacterias, se generó una curva estándar a partir de un plásmido que contenía el gen *amoA* a razón de  $3.78 \times 10^{10}$  copias· $\mu\text{L}^{-1}$ , con una serie de diluciones en base diez del plásmido ( $10^1$  a  $10^9$ ). La especificidad de los cebadores se verificó de dos formas, primero por el análisis de la curva *melting* (*Temperature melting* - *TM*). Inicialmente, la amplificación se verificó por análisis de la curva *melting* de los productos de PCR, en el cual se observó un solo pico *melting* a  $87.5^\circ\text{C}$ , y *TM* menores de  $81^\circ\text{C}$  fueron consideradas inespecificidades (Anexo P). Y segundo por la verificación del tamaño esperado del fragmento en pares de bases (491 pb), mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La curva de calibración obtenida fue lineal con una eficiencia calculada en 1.825, un error de 0.00469, una pendiente de -3.829 y un intercepto Y de 44.53 (Anexo R).

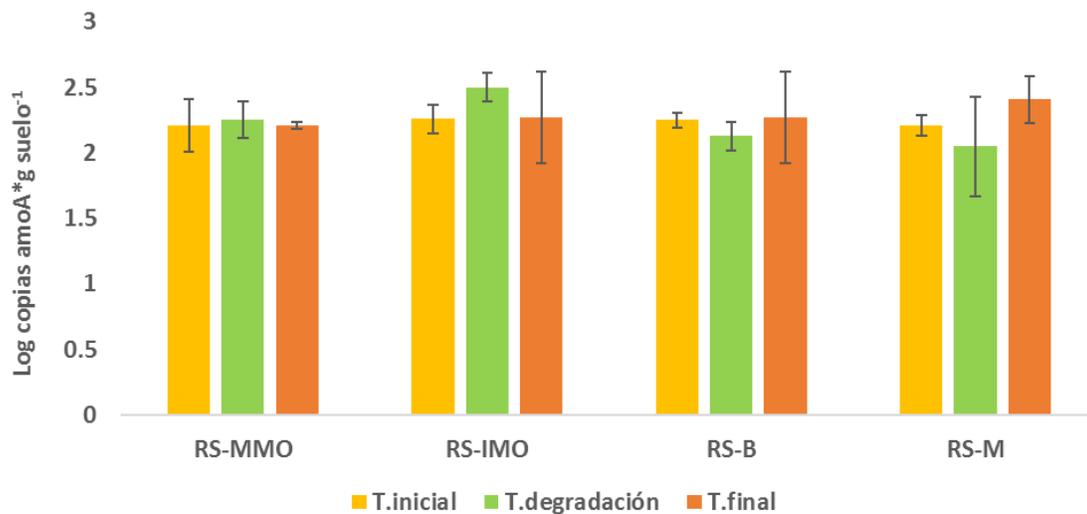
Para el gen *amoA* de arqueas (*AmoA.A*), se generó una curva estándar con una serie de diluciones en base diez del plásmido ( $10^1$  a  $10^9$ ) que contenía  $3.78 \times 10^{10}$  copias· $\mu\text{L}^{-1}$ . Una vez terminada la amplificación se verificó mediante *TM Calling* el pico correspondiente a la amplificación el cual fue a  $87.5^\circ\text{C}$ . Las inespecificidades de la reacción fueron consideradas a *TM* menores a  $84^\circ\text{C}$  (Anexo R). La confirmación de la amplificación específica se realizó por electroforesis en gel de agarosa, en la cual se identificó el tamaño del fragmento esperado (624 pb). La curva para el gen *amoA.A* fue lineal con una eficiencia calculada en 1.97, un error de 0.058, un valor de la pendiente de -3.39 y un intercepto Y de 31.14 (Anexo S).

En el caso del gen *nifH*, no fue posible obtener un plásmido, puesto que de todos los clones obtenidos ninguno tenía una homología de más del 80% con el gen *nifH*. Sin embargo, a pesar de no tener un plásmido, se evaluó la presencia del gen, en las muestras de suelo de arroz, según las condiciones descritas en la [tabla 2-1](#), con los cuales se obtuvo un fragmento de 450 pb. En el caso del gen *nifH*, la curva estándar fue elaborada con el DNA de suelo, empleando diluciones seriadas en base dos (2), partiendo de una concentración inicial de 10 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ . La TM correspondió a 90°C y las inespecificidades fueron consideradas como las TM menores de 86°C ([Anexo T](#)). La curva obtenida fue lineal con una eficiencia calculada en 1.710, un error de 0.0349, un valor de la pendiente de -4.293 y un intercepto Y de 34.20 ([Anexo U](#)).

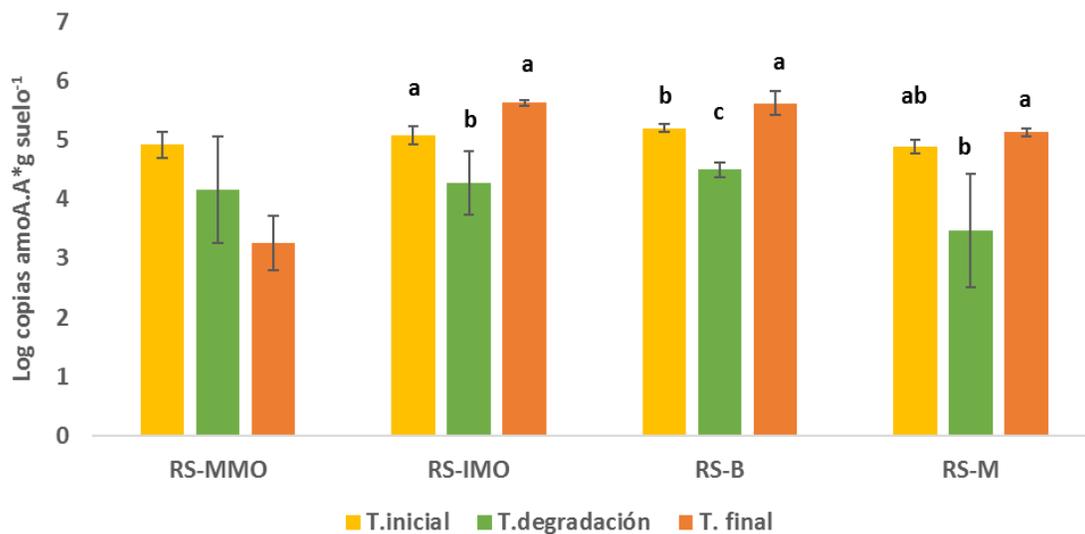
### **3.5.3 Cuantificación por qPCR de la presencia del gen *amoA*, *nifH* en muestras de suelos de arroz.**

Para el análisis del gen *amoA*, se emplearon las muestras de los tiempos (T0: tiempo inicial, T1: tiempo de degradación y T3: Tiempo final). Las muestras fueron normalizadas a una concentración de 12 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ . Los análisis revelaron ligeros cambios en los niveles de abundancia de los genes de *amoA* para todos los tiempos analizados; sin embargo, no se registró diferencias estadísticas significativas en el caso de bacterias ([Figura 3-39](#)), mientras que en el caso de arqueas, el único tratamiento que no presentó diferencias estadísticas significativas en el tiempo fue el tratamiento RS-MMO ([Figura 3-40](#)).

**Figura 3-38:** Abundancia de genes *amoA* de bacterias en el suelo de soporte en cada uno de los tiempos de muestreo.  $p \geq 0.05$  con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. RS-  
MMO:



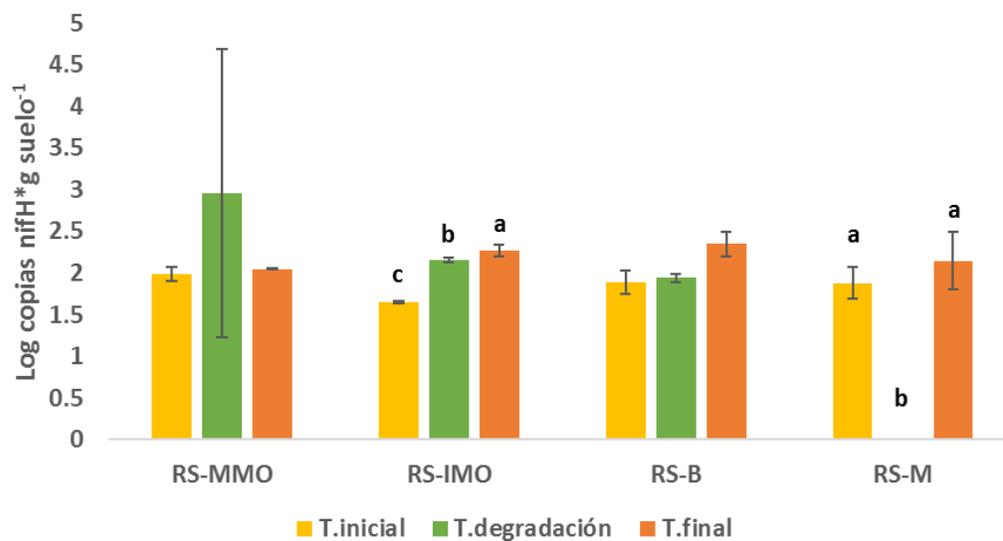
**Figura 3-39:** Abundancia de genes *amoA* de arqueas en el suelo de soporte en cada uno de los tiempos de muestreo. Diferentes letras corresponden a diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ) con ANOVA-Kruskal-Wallis.



Por último, para el análisis del gen *nifH*, se emplearon las muestras de los tiempos (T0: tiempo inicial, T1: tiempo de degradación y T3: Tiempo final). Las muestras fueron normalizadas a una concentración de  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Los análisis revelaron diferencias estadísticas significativas en el tratamiento RS-IMO, mostrando un incremento desde tiempo inicial a tiempo final. Mientras que para el tratamiento RS-M en los niveles de abundancia de los genes de *nifH* para el tiempo inicial y final no presentan diferencias estadísticas significativas, ambos se diferencian de manera significativa del tiempo de

degradación (Figura 3-41). Sin embargo, este resultado podría ser artefacto, debido a que, en el momento de realizar la medición en el laboratorio, se contaba con un duplicado y no un triplicado de la muestra (puesto que se gastó durante la secuenciación), los cuales eran diametralmente opuesto y debido a la escasez de la muestra no fue posible realizar nuevamente la medición.

**Figura 3-40:** Abundancia de genes *nifH* en el suelo de soporte. Diferentes letras corresponden a diferencias estadísticas ANOVA–Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



Nombre de la fuente: Elaboración propia

## 4. Discusión

### 4.1 Parámetros físico-químicos del suelo

El tamo de arroz (TA) contiene nutrientes que pueden ser benéficos para la fertilidad del suelo y el rendimiento del cultivo, así como puede mejorar los parámetros físico-químicos (Zhao et al., 2019), y biológicos del suelo, es decir mejorar la calidad (Turner et al., 2014).

En este estudio, el incremento de la materia orgánica fue alrededor del 58% en promedio, lo que indica una alta entrada de carbono independientemente del tratamiento aplicado ([Anexo C](#)). Este incremento positivo en el CO del suelo indicaría un beneficio a largo plazo de la aplicación de TA, tal como lo sugiere Chen et al., (2012). Cabe decir que este incremento fue detectado a pesar de que los cambios en el corto y mediano plazo en cuanto a carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) del suelo son difíciles de observar debido a la historia del carbono y a su variabilidad temporal y espacial (Jin et al., 2020).

Es importante mencionar que el contenido de TOC depende de la cantidad de tamo retornado (Lou et al., 2011). La falta de diferencias de los tratamientos de cobertura (*M*) y el tratamiento RS-IMO frente al tratamiento de quema fue diferente a lo esperado. Probablemente, debido a que en el tratamiento RS-B los residuos de la parte superior fueron quemados de manera incompleta e incorporados junto con las cenizas, y esto más la biomasa localizada bajo el suelo (raíces), contribuye de manera comparable a los demás tratamientos, al incremento del carbono orgánico en suelo en este tratamiento en particular (Chivenge et al., 2020).

Además, se ha demostrado que la incorporación de todo el TA en el suelo desde un campo con una producción de 9 ton de TA·ha<sup>-1</sup>, no produce un incremento significativo en términos de TOC, carbono orgánico disuelto, incluso biomasa microbiana de carbono en relación con 0% de TA incorporado (Zhu et al., 2015). De manera opuesta, en dicho estudio la

incorporación de 50% de TA (equivalente a  $\text{TA}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), generó un incremento significativo en todas las variables mencionadas anteriormente (Zhu et al., 2015). Estos autores sugieren que el retorno de un 100% de TA en un campo con una producción de 9 ton de  $\text{TA}\cdot\text{ha}^{-1}$ , podría interferir con la actividad microbiana bloqueando el intercambio de gases, lo cual podría reducir la actividad microbiana y así no tener efectos visibles sobre el carbono orgánico del suelo (Zhu et al., 2015).

Esto indica que la cantidad aplicada de TA es trascendental, ya que al aplicar cantidades excesivas de TA cuando la producción de arroz ha sido alta ( $\geq 10 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), reduciría la actividad microbiana y adicionalmente podría competir con el cultivo por el N, si no se permite su descomposición por un período mínimo de ~30 días, por debido a su alta proporción C:N (Hu et al., 2015). Ahora si la cantidad aplicada de TA es muy baja, mejoraría la descomposición del TA, sin embargo, la mineralización del carbono orgánico (CO) consumiría más CO, por lo que este se vería reducido en el suelo, generando un efecto de cebado (cambio en la descomposición microbiana del CO en respuesta a la entrada de C fresco) en el suelo (Jin et al., 2020).

Alternativamente, el incremento de la materia orgánica podría haber sido facilitado por la alta tasa de fertilización de N empleada en este ensayo, lo que permitiría disminuir la proporción C:N y así acelerar la degradación de TA. Además, el aumento de CO en todos los tratamientos podría ser consistente con una baja tasa de degradación esperada de TA (~13.9% por mes) (Chivenge et al., 2020).

El pH del suelo presentó una disminución hacia el final del cultivo para los cuatro tratamientos; el pH inicial fue de 5.24 y terminó en 5.06, 4.98, 4.91 y 4.69 para los tratamientos RS-B, RS-MMO, RS-IMO y RS-M, lo cual es consistente con los resultados obtenidos por Chen et al., (2012). Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos RS-B y RS-M ( $p = 0.02$ ); el valor de pH mayor en el tratamiento RS-B, puede deberse a que las cenizas del TA aplicadas en este tratamiento son consideradas como fertilizante de K (los cuales incrementan el pH en el suelo), debido al alto contenido ( $0.33\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de este elemento en las cenizas (Chen et al., 2012).

Las otras propiedades químicas del suelo, como los niveles de K, Na, Al, P y N, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en lo que corrió del experimento ( $p \geq 0.05$ ). Particularmente, los niveles de Ca, Mg, Na y la capacidad de

intercambio catiónico disminuyó al tiempo de la cosecha. Mientras el nivel de Al incrementó en todos los tratamientos. Los niveles de P incrementaron en el tiempo en los tratamientos RS-IMO y RS-B y permanecieron similares al valor inicial en los otros tratamientos.

## 4.2 Parámetros vegetativos, reproductivos y fitosanitarios del cultivo

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas significativas en rendimiento del cultivo entre los tratamientos (Tabla 3-1), vale la pena comentar que, en el ciclo de cultivo evaluado, el rendimiento fue superior (13 tonelada·ha<sup>-1</sup>) frente al rendimiento esperado para la variedad Fedearroz FL-68 (9 tonelada·ha<sup>-1</sup>) (Hernández León, 2016). El no encontrar diferencias significativas, es una respuesta similar a la encontrada por Zhu y col (2015), después de la evaluación del rendimiento anual de dos años, en un sistema de rotación arroz-trigo, cuando la tasa de retorno del tamo fue del 100%, contrario a un incremento de rendimiento con una tasa de retorno de TA de 50%. Cabe considerar que en el estudio de Zhu y col (2015), el rendimiento del cultivo bajo el retorno de TA siempre fue mayor en comparación al no retorno de TA, con los mayores rendimientos retornando el 50% de tamo (Zhu et al., 2015), en el primer ciclo de cultivo. Estos resultados señalan la importancia de aplicar TA e identificar la cantidad adecuada con el fin de obtener los mejores resultados en términos de calidad del suelo a través del tiempo.

Una observación importante es que el tratamiento RS-M produjo una tonelada·ha<sup>-1</sup> menos, en comparación a los otros tratamientos, esto es esperado debido al hecho de que el rendimiento de grano está estrechamente ligado al número de panículas producidas por plantas y el tratamiento RS-M fue el que presentó el menor número de panículas. Se genera entonces la hipótesis de que el efecto está asociado con el hecho de que este tratamiento tuvo el pH de suelo más bajo y los niveles más bajos de Ca y los más altos de Al. De acuerdo a Alam (1981), el pH del suelo tiene un efecto significativo sobre el crecimiento del arroz. Además, a bajos niveles de Ca, el transporte de iones puede estar dañado e incrementar el daño de membrana y promover pérdida de nutrientes. Adicionalmente, Panhwar (2014) mostró que el exceso de Al puede afectar el crecimiento de la plantas y dañar la disponibilidad de nutrientes del suelo debido a la inhibición del desarrollo de la raíz. Claramente dejar el TA como cobertura, bajo las condiciones experimentales evaluadas en este estudio, podría afectar la productividad del cultivo.

En cuanto al estado fitosanitario del cultivo ([Tabla 3-1](#)), con respecto a *Burkholderia glumae* un patógeno de la semilla de arroz que causa daño a la panícula y puede reducir el rendimiento en cerca del 46-75% del rendimiento del cultivo (Ham et al., 2011; Lee et al., 2015; Zhou-qi et al., 2016), no fue detectado en el campo en ninguno de los tratamientos. Esto debido posiblemente a que nuestro cultivo se realizó a mitad de año, donde las condiciones climáticas no son favorables para el desarrollo de la enfermedad (Ham et al., 2011; Shew et al., 2019; Zhou-qi et al., 2016).

En contraste, *Helminthosporium* sp. estuvo presente, pero con una incidencia significativamente menor presente en el tratamiento RS-IMO, que en los tratamientos de cobertura (*M*). Esto sugiere que la acción del consorcio microbiano usado en este tratamiento fue favorecida por la incorporación de TA al suelo. En contraste este mismo tratamiento incitó a una mayor incidencia de *Rhizoctonia* en comparación a los tratamientos RS-B y RS-MMO.

La falta de patrones distintivos en el estado fitosanitario del cultivo entre los tratamientos, frente a RS-B, sugiere la ausencia de un claro patrón de limpieza de patógenos del campo mediante la quema del TA. Lanoiselet y col (2005) en un experimento de laboratorio demostraron que la quema de TA puede eliminar *Rhizoctonia* ( $\leq 121^{\circ}\text{C}$ ) o inhibir su desarrollo ( $\leq 110^{\circ}\text{C}$ ). Posiblemente, la quema puede reducir el inóculo en el suelo a la forma de esclerocio dormante, sin embargo, no lo erradica completamente. Es importante recalcar que el efecto de la quema es dependiente de la intensidad, la cantidad, el contenido de humedad, la calidad del TA, la velocidad del viento, duración de la quema y temperatura (Lanoiselet et al., 2005). Por otro lado, la consolidación del inóculo del patógeno a partir del TA al siguiente ciclo de cultivo, dependerá también de la concentración del patógeno (Zhu et al., 2014).

### 4.3 Objetivo1: Evaluar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre la estructura (abundancia y riqueza de especies) y función de la comunidad microbiana del suelo asociada a un cultivo de arroz

#### 4.3.1 Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo rizosférico en tiempo de floración

Los datos mostraron que la comunidad microbiana, en la etapa de floración fue afectada notablemente por los tratamientos evaluados. A pesar de que la **alfa diversidad** tanto en bacterias como en hongos, fue bastante similar entre los tratamientos, la alta diversidad de las comunidades microbianas puede ser debida al efecto rizosférico comparada con el correspondiente suelo de soporte (Edwards et al., 2018), y a los ciclos de inundación y drenaje, lo que involucra tanto bacteria aerobias como anaerobias (Jiao et al., 2019). Es importante aclarar que un solo cultivar fue estudiado y que otros factores diferenciadores como rizocompartimentos (rizósfera, rizoplano, endosfera) (Edwards, et al., 2015), regímenes de fertilización (Zhan et al., 2018) y etapa de crecimiento de la planta (Edwards et al., 2018) no se analizaron en este estudio.

La dicotomía en los tratamientos en cobertura (*M*) frente a los tratamientos tempranamente incorporados (*E*) observada en la **beta-diversidad** (Figura 3-1), el agrupamiento jerárquico (Anexo F) y el análisis del microbioma **core** (Figura 3-2), sugiere que los tratamientos ensamblan de manera diferencial la comunidad bacteriana posiblemente debido a que se encuentran en momentos sucesionales diferentes.

Uno de los mayores resultados de esta diferencia es la presencia de bacterias acidófilas, como *Bryobacter* en el grupo *M*. Esto probablemente se deba a una degradación más lenta en el TA dejado en superficie, el cual fue incorporado de manera tardía, casi al momento de la siembra, lo que conduciría a un estado sucesional diferente en la comunidad, particularmente en el tratamiento RS-M sin la aplicación de microorganismos degradadores. Este hallazgo es particularmente importante, debido a que el efecto fue observado en la etapa de floración, sugiriendo de esta manera que la composición de la comunidad bacteriana asociada al cultivo de arroz está sujeto a las medidas agronómicas tomadas en el momento previo a la preparación del terreno en el momento de la siembra. Cabe aclarar que, a pesar de que no se presentaron cambios estadísticamente

significativos a nivel de productividad, el tratamiento RS-M generó una tonelada menos en producción lo que indudablemente representa una gran diferencia para el productor. Esto sugiere que el tratamiento RS-M sin la aplicación de MO no es adecuado por sus efectos en el pH del suelo y la productividad del cultivo, que, si bien no es significativa, es considerable para la economía de los agricultores. Estos hallazgos indican que, en caso de emplear el TA como cobertura sin aplicación de microorganismos se necesita corregir el pH con el fin de contrarrestar las pérdidas de producción (Chivenge et al., 2020).

La dominancia de los filos particulares encontrados en este estudio como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* es consistente con estudios previos en cultivos de arroz y en otras plantas. Tales filos son considerados habitantes comunes del suelo (Edwards et al., 2015; Edwards et al., 2018; Guo et al., 2020). La clara dicotomía entre los grupos de tratamientos *M* y *EI* está soportado por la abundancia diferencial de *Proteobacteria*, *Epsilonbacteraeota* y *Bacteroidetes* (más abundante en el grupo *EI*) y *Acidobacterias* (más abundantes en el grupo *M*) (Anexo G).

Posiblemente, el incremento en la abundancia de los tres filos mencionados anteriormente en el grupo *EI* comparado con el grupo *M* está relacionado con una mayor actividad de degradación como lo mostró la **predicción** realizada a través de PICRUSt2 (Figura 3-3) en los tratamientos *EI*. Sin embargo, este método de predicción de funciones bacterianas requiere precaución en el análisis de los resultados generados, debido a que esto depende de la disponibilidad de los genomas de referencia anotados en una base de datos particular y puede ser fuertemente y diferencialmente afectada por la transferencia horizontal de genes a través de los genomas de los miembros de una comunidad microbiana (Jiménez et al., 2014).

A pesar de las precauciones que se deben tener con el uso e interpretación de PICRUSt2, merece la pena mencionar que en particular *Bacteroidetes*, ha sido asociado con degradación de material lignocelulósico (Jiménez et al., 2014), sus genomas tienen gran número de genes codificando para bioconversión de celulosa y hemicelulosa, sugiriendo un papel fundamental en los procesos de biodegradación en el grupo *EI*. Sin embargo, se deben realizar más análisis para confirmar este tipo de correlaciones.

Las *Gamma-Proteobacterias* fue la clase de *Proteobacterias* más abundantemente encontrada en todos los tratamientos (Anexo H). La abundancia de este grupo está

relacionada a un incremento de la relación C:N del suelo (Hermans et al., 2017). Se presume una posible conexión con el aumento de C de bajo peso molecular, que se encuentra en la descomposición de la materia orgánica y en los exudados de las raíces (Cleveland et al., 2007). De forma similar, muchos tipos de *Bacteroidetes* y *Bacillus*, son organismos de rápido crecimiento involucrados en la degradación de polisacáridos (Cleveland et al., 2007; van der Lelie et al., 2012).

Se ha demostrado que las *Acidobacterias* (que son consideradas bacterias oligotróficas), dominan los ambientes escasos de nutrientes (Cleveland et al., 2007; Fierer et al., 2007), mientras las *Gamma-Proteobacterias* (copiotrofas), dominan en sistemas con alta abundancia de compuestos de carbono de bajo peso molecular. Así la cantidad de carbono lábil presente en un sistema, puede ser el factor clave de la abundancia de bacterias oligotróficas frente a las copiótrofas (Fierer et al., 2007).

En este contexto, la significativa alta abundancia de *Gama-Proteobacterias* y *Bacteroidetes* en el grupo *EI* frente al grupo *M* (Anexo H), indica una disponibilidad diferencial de compuestos carbonados de bajo peso molecular asociados a estos dos grupos de tratamientos, indicando así diferencias en el metabolismo del C del suelo. Tales diferencias, podrían ser determinadas incluso por la descomposición de materia orgánica o a un efecto diferencial de los tratamientos sobre la rizodeposición de las plantas o al estado físico-químico del suelo.

Por otro lado, *Micromonospora* es una actinobacteria involucrada en la degradación de materiales recalcitrantes. En estrecha asociación con las raíces de las plantas, se destaca por rasgos funcionales como la fijación de N y la producción de compuestos bioactivos (Trujillo et al., 2015). La mayor abundancia en el grupo *M* de estos dos géneros indica un rol particular en el recambio de materia orgánica al tiempo de floración, probablemente debido a su tardía incorporación al suelo en comparación a los tratamientos del grupo *EI*.

### **4.3.2 Composición, estructura y función de la comunidad fúngica en suelo rizosférico en tiempo de floración**

Con respecto a los fungomas, los bajos niveles de **diversidad** encontrados a través de los tratamientos en relación a las bacterias (Anexo E) es similar a lo encontrado por Guo (2020). Esto es compatible con el principio de que los hongos son menos competitivos que las bacterias en suelos húmedos (Tian et al., 2013). Por otro lado, se encontró un alto

porcentaje de OTUs no identificados (40%) que solo pudo ser asignado al reino hongo, incluyendo los pertenecientes al **core**. Estos resultados son consistentes con el hecho que bajos porcentajes (<5%) de hongos han sido descritos en las bases de datos (Mueller & Schmit, 2007), o a la falta de secuencias de referencia o que se encuentran mal anotadas, o simplemente son anotadas a niveles altos de clasificación taxonómica como reino o filo (Nilsson et al., 2016). A pesar de la importancia ecológica y biotecnológica de los hongos en el neotrópico, permanecen sin caracterizar y dilucidar la riqueza de estos microorganismos en estos ecosistemas.

El filo *Ascomycota* fue el más abundante a través de todos los tratamientos ([Anexo J](#)). Esto fue similar a lo reportado por Nie y col y Guo y col en suelos bajo inundación de cultivo de arroz (Guo et al., 2020; Nie et al., 2018b). La dominancia de *Ascomycota* puede ser debido a los altos contenidos de N aplicados a los suelos. La aplicación de N cambia la composición de la comunidad fúngica suprimiendo los *Basidiomycetes* encargados de la descomposición de lignina (Nemergut et al., 2008), y aumentando los microorganismos pertenecientes al filo *Ascomycota*, que son reconocidos por su capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa. Adicionalmente, los ascomicetes asimilan C a partir de TA particularmente en la etapa tardía de la descomposición (Guo et al., 2020).

A nivel de orden ([Anexo J](#)), los taxones más representados fueron *Sordariales*, *Hypocreales*, *Pleosporales* y *Eurotiales*, reconocidos como hongos de estrategia r (Sterkenburg et al., 2015), los cuales debido a su habilidad de crecimiento rápido son capaces de colonizar y usar sustratos simples como celulosas y hemicelulosas (Gallardo et al., 2020) que pueden ser adquiridos con la incorporación del TA, lo que podría explicar su mayor abundancia. La incorporación del TA ejerció un efecto sobre la abundancia de estos órdenes cuando se compara con la quema, sin embargo, estos efectos no reflejaron diferencias estadísticas significativas. Los *Sordariales* por su parte se encontraron en baja abundancia en el tratamiento RS-B, probablemente relacionado no solo con el hecho de que estos microorganismos se encuentran de manera común en detritos de plantas y residuos de cultivo, debido a su capacidad para producir enzimas lignocelulolíticas (Huhndorf et al., 2004), sino también a que este tratamiento contenía la menor cantidad de TA incorporado.

Por otro lado, *Hypocreales* es un orden que incluye el género *Trichoderma*, el cual presentó mayores AR en los tratamientos con aplicación de microorganismos (RS-MMO y RS-IMO), lo que se esperaba y constituye una ventaja, ya que *Trichoderma* fue aplicado por su capacidad degradadora y antagonista. Sin embargo, el nivel de resolución de las secuencias no permitió llegar a la identificación de este género. Adicionalmente, los órdenes *Pleosporales* y *Eurotiales* incrementaron en el tratamiento RS-B, lo cual es interesante debido a que muchas de las especies incluidas en estos órdenes son saprofitos y/o patógenos de plantas (Zhang et al., 2009), esto indicaría que no necesariamente la quema elimina los patógenos que pueden estar en el suelo. Cabe resaltar que, a pesar de que los órdenes mencionados anteriormente fueron los más abundantes, no se diferenciaron significativamente entre los tratamientos. Finalmente, entre los géneros identificados se encuentran *Penicillium*, *Lagena*, *Aspergillus*, *Edenia*, *Apiosordaria* y *Talaromyces*, los cuales son géneros comúnmente encontrados en suelos (Hong et al., 2010).

En este estudio se encontraron órdenes como los *Sordariales* (incluido en el **core** (Figura 3-5)), considerados descomponedores primarios de TA (Alberto et al., 2015) y *Pleosporales*, el cual fue previamente reportado con incrementos en la etapa de floración debido a su capacidad de usar fuentes de C a partir de los exudados de la raíz. También ambos órdenes han sido reportados como productores de celobiohidrolasas como respuesta al aumento en la entrada de carbono fresco. Otro de los órdenes incluidos en el **core** fue el de los *Sebacinales* que abarca principalmente ecto- y endo-micorrizas, así como endófitos, reconocidos como promotores de crecimiento de planta y tolerantes al estrés.

El agrupamiento jerárquico desarrollado sobre el **core** (Figura 3-5) permitió generar la hipótesis de que la presencia tanto del inóculo microbiano, así como el TA, contribuyen a la formación de la estructura de la comunidad fúngica asociada al arroz. Incluso pueden acelerar la degradación de material lignocelulósico, favoreciendo otros hongos filamentosos o bacterias que quizá pueden ser principales descomponedores en el sistema (Anasontzis et al., 2017). Adicionalmente, podrían controlar enemigos microbianos para el establecimiento de una comunidad bacteriana o fúngica benéfica.

La predicción de la **funcionalidad** de la comunidad fúngica fue realizada con FunGuild, donde solo una fracción (14.16%), de la comunidad fúngica pudo ser asociada a un modo trófico particular (Figura 3-6). Mientras otros investigadores como Nie y col., (2018b) en un

estudio de 34 años de fertilización de una estación experimental en China lograron asignar el 74% de los taxones en suelos anegados de arroz con diferentes regímenes de fertilización.

Suponemos entonces que nos enfrentamos en la zona de estudio, a una alta prevalencia de taxones de hongos diversos y aún no asignados en las bases de datos de hongos. La mayoría de OTUs identificados pertenecen a hongos saprótrofos presentes en todos los tratamientos. Siendo ligeramente mayor en tratamientos de cobertura. Estos hongos saprótrofos contribuyen a la mineralización de C, ya que ellos son efectivos descomponedores de la materia orgánica y mineralizadores de carbono en los suelos (Tung et al., 2016).

#### **4.3.3 Composición, estructura y función de la comunidad bacteriana en suelo de soporte en los tiempos inicial, degradación y final**

De acuerdo con los resultados obtenidos en las curvas de rarefacción ([Anexo L](#)), visualizadas ya sea a través de los tratamientos o a través del tiempo, se pudo observar que las muestras son comparables entre sí, excepto una réplica del tratamiento RS-B. También se hace necesario aclarar que no fue posible alcanzar la asíntota de la curva, lo cual nos indica que la diversidad del suelo de soporte es probablemente mucho mayor y que se requiere un mayor esfuerzo de muestreo para poder identificarla.

##### **$\alpha$ y $\beta$ diversidad a partir del 16S rRNA en tiempo inicial, degradación y final**

La **alfa diversidad** de las comunidades microbianas de suelo de soporte de tiempo final (el cual fue el más diverso), se diferenció del tiempo inicial y de degradación ([Figura 3-8](#)), posiblemente debido a la presencia del cultivo, así como a la aplicación de fertilizantes y fungicidas (Kato et al., 2015), y a la edad y genotipo de la planta (Edwards, et al., 2015; Knief et al., 2012; Sessitsch et al., 2012).

El análisis de **beta diversidad** ([Figura 3-9](#)) señaló que, la variabilidad de los datos puede ser explicada con un 20.1%, un porcentaje bajo, que deja abierta la posibilidad de señalar que las variaciones que se presentan en la comunidad no son únicamente reflejo de la

aplicación de los tratamientos y que pueden existir en este trabajo de campo muchos otros factores que pueden causar variabilidad sobre la comunidad.

Este análisis de igual forma permitió visualizar que los datos de tiempo inicial y tiempo de degradación se agruparon dejando aparte las muestras de tiempo final, adicionalmente las muestras de tiempo inicial correspondientes al tratamiento RS-M se agruparon de manera independiente de los otros dos grupos (Figura 3-9). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas. Posiblemente, debido a la capacidad de amortiguación generada por el suelo o a los antecedentes del mismo, lo cual permite que la comunidad permanezca más estable y más resiliente a los disturbios que se puedan realizar en el suelo, convirtiéndolo en un nicho estable (Chialva et al., 2020).

### **Composición taxonómica a partir del 16S rRNA en tiempo inicial, degradación y final**

La **composición taxonómica** del microbioma revelado aquí, es consistente con estudios previos relacionados a comunidades asociadas a cultivos de arroz (Edwards et al., 2019; Edwards et al., 2015; Wang et al., 2020). Se identificaron 28 filas (Figura 3-10), dos de los cuales pertenecían al dominio arquea como son *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*, metanobacterias características de suelos inundados de cultivos de arroz (Edwards et al., 2015; Bissett et al., 2013). Mientras en el dominio bacteria los filas más abundantes correspondieron a *Proteobacterias*, *Acidobacterias*, *Firmicutes*, *Actinobacterias*, *Chloroflexi* y *Planctomycetes*.

A nivel de género, se quiso identificar los diez taxones que presentaron mayor abundancia relativa entre los tratamientos (Figura 3-12) y a través del tiempo (Figura 3-13). Se encontró *Bacillus sp* (filo *Firmicutes*) y *Ca. Solibacter* (filo *Acidobacteria*), ambos asociados en previos estudios al cultivo de arroz y con capacidad de degradación de carbono y producción de metabolitos secundarios (Navarrete et al., 2015; Rawat et al., 2012). Los otros taxones fueron afiliados a filas como *Firmicutes* (2), *Acidobacteria* (3), *Chloroflexi* (1) y *Proteobacteria* (1). Es particularmente interesante que los dos primeros taxones más abundantes corresponden al filo *Firmicutes* y al género *Bacillus*, especialmente en el tiempo de degradación, posiblemente esté relacionado con la aplicación de los tratamientos y al proceso de degradación en sí.

La comparación a través del tiempo, mostró nuevamente los mismos 10 taxones, donde se pudo identificar que para el caso de las *Acidobacterias*, el aumento en la abundancia relativa se realizó hacia el tiempo final, relacionado posiblemente con la disminución en el pH de todos los tratamientos en comparación al tiempo inicial; sin embargo, además de su relación con el pH, como se mencionó anteriormente este grupo de microorganismos están relacionados con degradación de compuestos de carbono más recalcitrantes (Navarrete et al., 2013; Eichorst et al., 2018). El mismo comportamiento lo presentó el taxón perteneciente al filo *Proteobacteria*. Microorganismos pertenecientes a las *Proteobacterias* son conocidos supresores de la enfermedad (Mendes et al., 2011) y esto podría ser un factor protector frente a la presencia de fitopatógenos.

#### **Abundancia diferencial a partir del 16S rRNA en tiempo inicial, degradación y final**

Los análisis de abundancia diferencial para el tratamiento RS-M, no mostraron diferencias estadísticas significativas en el tiempo. Sin embargo, su contraparte el tratamiento RS-MMO, presentó el mayor número de diferencias estadísticas significativas, todas ellas entre tiempo inicial y tiempo final (Figura 3-14). El hecho de que en tiempo de degradación no se encontraran diferencias estadísticas significativas, sugiere que el tratamiento RS-MMO la aplicación del tratamiento homogenizó la comunidad, evitando una disminución o incremento en los taxones presentes en este tiempo de muestreo, cabe recordar que en tiempo inicial este tratamiento se encontraba separado de todos los otros tratamientos.

En tiempo inicial, taxones como *Bryobacter*, *Polaromonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Blastocatellia*, *Ruminiclostridium*, *Nostoc*, *Methylobacterium* y *Pedomicrobium* se encontraban aumentados, sufriendo una disminución a tiempo final. Del mismo modo sucedió con los órdenes, *Enterobacteriales*, *Chloroflexales*; *Tepidisphaerales* y *Rhizobiales*. Estos géneros y ordenes de microorganismos están relacionados con degradación de lignocelulosa (Ivanova et al., 2020; Kovaleva et al., 2015; Kulichevskaya et al., 2010; Ren et al., 2019), formación de biopelículas (Kielak, Barreto, et al., 2016), fijación de nitrógeno (Han et al., 2020; Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017), y algunos son oportunistas que pueden llegar a ser patógenos para humanos (Adeolu et al., 2016; Gallego et al., 2005), lo que nos señala una biodiversidad amplia en el suelo antes de iniciar los tratamientos.

Para tiempo final, en el tratamiento RS-MMO, 38 de los taxones que se encontraban aumentados en tiempo inicial, disminuyeron en tiempo final. Entre los cuales se encontraban *Methylomonas*, *Methylocistis*, *Vulcanibacillus*, *Hydrogenispora* y *Ca. Koribacter* a nivel de género; siendo la mayoría (10) clasificados como *uncultured bacterium*. Los dos primeros taxones bacterianos son reconocidos metanotrofos (Kumar et al., 2019; Shiau et al., 2020), mientras que los últimos tres taxones son reconocidos degradadores de carbohidratos simples y algunos carbohidratos complejos (Kielak, Cipriano, et al., 2016). La disminución en tiempo final de estos microorganismos probablemente sea debido a las condiciones ambientales en el suelo como cambios en el pH, pero principalmente a que son microorganismos copiótrofos que a medida en que se agotaban los recursos en forma de compuestos de carbono lábil, fueron disminuyendo, esto posiblemente ejerció una presión de selección en ellos.

Los análisis del tratamiento RS-IMO, muestran diferencias significativas en algunos taxones, entre el tiempo de degradación y el tiempo final (Figura 3-15). En este caso taxones pertenecientes a *Acidobacteria*, *Clostridiales*, *Sulfuricurvum* y *Thiovulaceae* estaban aumentados en tiempo final. Esto nos sugiere que al ser estos microorganismos degradadores de material lignocelulósico (Ichikawa et al., 2017; Song et al., 2019), este proceso de degradación continúa incluso hacia el final del ciclo de cultivo. Estos resultados están acorde a lo encontrado por Bao et al., (2020) quién señaló que el proceso de degradación es bastante lento y depende de la relación C:N. *Brevibacillus* disminuyó en tiempo de degradación; este género es conocido por ser un gran productor de proteasas y adicionalmente un buen biocontrolador al producir péptidos con actividad antimicrobiana (Ahmed et al., 2018). Este resultado sugiere que la aplicación del consorcio microbiano ejerce un efecto sobre la comunidad microbiana, disminuyendo algunos de los microorganismos biocontroladores que se encuentran en suelo, como es el caso de *Brevibacillus*.

Por último, para el tratamiento RS-B (Figura 3-16), en tiempo inicial aumentaron las *Comamonas*, microorganismos reconocidos por su papel en el proceso de desnitrificación y amonificación dentro del ciclo de nitrógeno y por utilizar diversas fuentes de nutrientes y almacenar el carbono como gránulos de polihidroxibutirato (Wu et al., 2018). Finalmente, en el tiempo de cosecha se presentó el mayor número de taxones pertenecientes a géneros como *Vulcanibacillus*, un microorganismo formador de endospora aislado de

ventosas hidrotermales en el mar (Abin & Hollibaugh, 2016). Posiblemente su capacidad para producir endosporas fue lo que permitió resistir a la quema y tener una ventaja frente a los otros microorganismos que se ve reflejada en aumento a tiempo final. Adicionalmente, en el genoma de estos microorganismos se han identificado múltiples vías involucradas en el metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos (Abin & Hollibaugh, 2016); de esta manera este microorganismo podría ser uno de los contribuyentes a la degradación de material vegetal en este tratamiento.

Entre los órdenes identificados con mayor abundancia en el tiempo final en comparación a los otros tiempos de muestreo, se encontró los órdenes *Gemmatales*, *Azospirillales*, reconocidos como promotores de crecimiento vegetal (Cassán et al., 2020). De igual forma fueron identificados *Planctomycetales*, unos oxidadores anaerobios de amonio (Suleiman et al., 2016), posiblemente una población que fue favorecida por la alta concentración de fertilización nitrogenada aplicada durante el cultivo.

Vale la pena mencionar que mientras los tratamientos RS-IMO y RS-B presentaron un aumento diferencial de taxones en el último tiempo de muestreo, el tratamiento RS-MMO tuvo un comportamiento opuesto, disminuyendo el número de taxones en tiempo final. Esto sumado a la falta de diferencias en el tratamiento de RS-M, sugiere que incorporar el TA o dejarlo en cobertura, determina que las comunidades microbianas del suelo de soporte se encuentren en un estado de sucesión diferente, evidenciado particularmente hacia el final del ciclo de cultivo.

Adicionalmente, este estudio evidenció la presencia de microorganismos copiótrofos en el tiempo inicial y presencia de oligotrofos a tiempo final del ensayo. Estos resultados son similares a lo reportado por Maarastawi y col (2018a; 2018b) en un experimento en microcosmos con tamo marcado y no marcado en rotación arroz-maíz, posiblemente esto se explique ya que la degradación del TA se ve inducida por la presencia de copiótrofos que toman ventaja del carbono orgánico lábil y fácilmente disponible lo que les permite una mayor abundancia (Pascault et al., 2013). Mientras tanto debido al proceso de degradación, hacia el final del ciclo de cultivo, se aumentaron los microorganismos oligotrofos como las *Acidobacterias* y *Actinobacterias*. Microorganismos capaces de crecer en ambientes escasos de nutrientes, en este caso en las etapas más tardías del ciclo de

cultivo, donde se incrementa la presencia de compuestos de carbono más complejos como la lignina (Watanabe et al., 2013) los cuales no son fácilmente metabolizados (Fierer et al., 2007; Kielak, Cipriano, et al., 2016).

#### **Microbioma central (*core*) a partir del 16S rRNA en tiempo inicial, degradación y final**

Uno de nuestros objetivos fue definir el **core** persistente de la comunidad, ya que es crítico para entender el ensamblaje y la estabilidad de la comunidad (Shade & Handelsman, 2012). El análisis indicó que el *core* está conformado por 564 taxones afiliados a géneros como *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Ca Koribacter*, *Bryobacter*, *Solibacter* y *Edaphobacter* (Figura 3-17). Estos taxones están relacionados con degradación de material lignocelulósico y promoción de crecimiento de plantas. Debido a que se encuentran conservados a través de los tratamientos y a través del tiempo, estaría indicando que son microorganismos adaptados al cultivo (Lundberg et al., 2012). *Bradyrhizobium* ha sido encontrada haciendo parte del *core* en otros campos de arroz al igual que *Bacillus* en cultivos de arroz en regiones de alta temperatura media anual en diferentes lugares en la China (Jiao et al., 2019).

Los microorganismos del *core* que están adaptados al cultivo promueven interacciones relacionados probablemente con la degradación de la materia orgánica en descomposición. El análisis del *core* muestra que el tiempo inicial y el tiempo de degradación comparten mayor número de taxones (223 OTUs), confirmando que las diferencias encontradas son principalmente generadas en el tiempo posiblemente debido a los cambios durante la descomposición de materia orgánica en suelo (Van Bruggen & Semenov, 2000).

#### **Redes de co-ocurrencia a partir del 16S rRNA en tiempo inicial, degradación y final**

Con el fin de identificar asociaciones entre las poblaciones muestreadas, se realizó el análisis de las interacciones ecológicas inferidas a través del análisis de **redes de co-ocurrencia**, estos análisis pueden ser usados para determinar la importancia de las interacciones entre los microorganismos en una comunidad. Las comunidades identificadas en el tratamiento RS-MMO exhibieron una mayor complejidad reflejada por el incremento en la densidad de la red (número de ejes positivos y número de ejes negativos) en comparación a RS-M (Tabla 3-2), indicando posiblemente que los microorganismos aplicados tienen influencia sobre las comunidades microbianas asociadas al cultivo de

arroz. Mientras que, si estos microorganismos son aplicados al TA en cobertura, pero este es inmediatamente incorporado, tienen un comportamiento similar al tratamiento RS-B, sugiriendo que la incorporación en la matriz del suelo tiende a reducir el efecto de los MO aplicados sobre la complejidad de la comunidad microbiana del TA.

Ahora bien, la identificación de módulos en las redes de co-ocurrencia pueden indicar que se estén llevando a cabo procesos ecológicos que gobiernan la estructura de la comunidad (Lima-Mendez et al., 2015; Ma et al., 2020). Los módulos simplifican datos de alta multidimensionalidad (Williams et al., 2014). En este análisis se encontró un mínimo de 13 y un máximo de 16 módulos en los tratamientos evaluados, los cuales podrían indicar gradientes ambientales (Ma et al., 2020) que deberán ser explorados a profundidad con el fin de identificar procesos ecológicos importantes y diferenciadores en las diferentes comunidades de cada uno de los tratamientos.

El análisis de las redes en cada uno de los tratamientos identificó diferentes **key taxa** para cada uno de los tratamientos. En general los microorganismos identificados como *key taxa* son considerados como indicadores de la salud del suelo. Esto se debe a que son capaces de controlar sus interacciones con otros actores de la comunidad (Berry & Widder, 2014), (Van Bruggen & Semenov, 2000). Adicionalmente ejercen un efecto desproporcionado sobre el ecosistema, en relación a su abundancia (Power et al., 1996), y reflejan procesos que están involucrados con la coexistencia y mantenimiento de la diversidad entre las comunidades (HilleRisLambers et al., 2012).

Los diferentes *key taxa* de este estudio contaban con un promedio de siete conexiones, excepto para el tratamiento RS-B, el cual presentó un máximo de dos conexiones con otros microorganismos. Esto muestra que los tratamientos con tamo generan mayores interacciones, sugiriendo redes más complejas con una mayor posibilidad de prestar diversos servicios ecosistémicos. Se sabe además que cuando los microorganismos se encuentran filogenéticamente relacionados, tienden a co-ocurrir de manera positiva (Lozupone et al., 2012), tal como ocurrió en el tratamiento RS-MMO con *Paenibacillus* y *Clostridium* pertenecientes al filo de *Firmicutes*.

A diferencia de lo que reportó Banerjee et al., (2016), en un microcosmos de suelo de soporte con tamo de trigo a *Gemmatimonas* y *Acidobacteria* como *key taxa*, las cuales estaban relacionadas a descomposición de materia orgánica, en este estudio no se encontraron dichos filos asociados. Sin embargo, si se encontraron taxones asociados con degradación de material lignocelulósico como *Paenibacillus*, *Actinobacteria*, *Clostridium* y *Bacillus* esto sugeriría que estos taxones cumplen un rol de alto impacto en la estructura función y ciclaje de nutrientes en cada una de las comunidades, donde pueden servir como reservorio de diversidad genética, funcional e incluso actuar como un sistema de amortiguamiento frente a los cambios generados por la aplicación de cada uno de los tratamientos empleados (Brown et al., 2009).

Este estudio se realizó en la misma localización geográfica, bajo un mismo tipo de suelo, aplicando diferentes tratamientos, y se encontraron *key taxa* exclusivos para cada suelo bajo diferente tratamiento del TA, sugiriendo que los tratamientos empleados ejercen un efecto diferente sobre la comunidad microbiana. Llama la atención que en un estudio reportado por Lupatini et al., (2014) en dos biomas de Brasil, encontraron *Proteobacterias*, *Actinobacterias*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* como *key taxa*, los cuales fueron exclusivos de cada uso del suelo, indicando que los tratamientos evaluados sobre el TA ejercen una influencia similar a la evidenciada para diferentes usos del suelo.

#### **4.3.4 Análisis del potencial funcional en los tiempos inicial, degradación y final**

En este estudio se buscó a través de la metagenómica identificar vías metabólicas que permitieran señalar la variación entre los tratamientos en cada tiempo de muestreo o a través del tiempo.

##### **Análisis de las vías metabólicas en los datos metagenómicos**

Aunque no se identificaron diferencias significativas en las vías metabólicas entre los tratamientos, estas fueron identificadas a través del tiempo entre tiempo inicial y tiempo final ([Anexo R](#)), siendo mayores que las encontradas entre tiempo de degradación y tiempo final ([Figura 3-21](#)). Cabe recalcar que las diferencias más altas se encontraban relacionadas con sistemas de transporte de aminoácidos, sistemas de dos componentes y un sistema múltiple de transporte de azúcares, los cuales están relacionados con la

importación de nutrientes (principalmente carbono), vitaminas y elementos traza como hierro, zinc y cobre al citoplasma de los microorganismos. La disminución de estos sistemas de transporte a tiempo final estaría indicando que los microorganismos probablemente en este tiempo de muestreo se encuentran en funciones diferentes a la adquisición/importación de nutrientes. Posiblemente, esto esté relacionado con la presencia del cultivo, que puede ejercer un efecto sobre el potencial funcional asociado a la comunidad.

Es importante recalcar que no se encontraron diferencias entre tiempo inicial y de degradación, donde se esperaba encontrar las más grandes diferencias. Estos resultados estarían indicando que la incorporación de grandes cantidades de materia orgánica permite una homogenización entre los tratamientos o que el tiempo de medición de la respuesta no fue el adecuado para identificar las posibles variaciones en las vías metabólicas potenciales que presenta la comunidad en respuesta a los tratamientos.

### **Análisis de los grupos de genes biosintéticos (BGCs)**

En cuanto al análisis de los **grupos de genes biosintéticos (BGCs)**, agrupaciones de genes que codifican enzimas biosintéticas para producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Borsetto et al., 2019; Cimermanic et al., 2014), este estudio identificó la presencia de BGCs asociados a los tratamientos aplicados (Figura 3-19). Estos BGCs podrían estar desempeñando un papel fundamental en la defensa de la planta contra la presencia e incidencia de los fitopatógenos estudiados. En la identificación de los BGCs, el tratamiento RS-M fue el que menos recuentos de BGCs presentó, esto nos estaría indicando un posible efecto de los tratamientos sobre la presencia de BGCs, ya que los tratamientos con microorganismos adicionados fueron los que presentaron mayores recuentos de BGCs.

El tratamiento RS-MMO por su parte, fue el único en el que se identificaron arilpolienos (APE), los cuales pueden funcionar como agentes protectores (pigmentos) contra el estrés oxidativo (Cimermanic et al., 2014), y son frecuentemente encontradas en *Proteobacterias*, el grupo de mayor abundancia relativa entre los tratamientos, y bacterias del grupo CFB (*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*) (Schöner et al., 2016).

Por su parte, el tratamiento RS-IMO fue el que mayores recuentos de BGCs presentó, con mayor presencia de lipopéptidos, policétidos y terpenos, además fue el único que presentó bacteriocinas y también presentó péptidos no ribosomales (NRPS), aunque no fueron los mayores recuentos. Los lipopéptidos, compuestos de bajo peso molecular suprimen el crecimiento de patógenos, poseen actividad lítica contra un amplio espectro de microorganismos, participan en la protección contra depredadores y están involucrado en la motilidad, la formación y desarrollo de biopelículas, quelación de iones metálicos y degradación de xenobióticos (Raaijmakers et al. 2010). Adicionalmente, inducen resistencia sistémica en la planta (Hasem et al., 2019), confiriendo protección del cultivo frente al ataque de fitopatógenos.

Por su parte los péptidos no ribosomales (NRPS), son las familias de metabolitos secundarios más abundantes (Dror et al., 2020) e incluyen funciones como antimicrobianos, moléculas de comunicación, pigmentos con función de protección contra estrés oxidativo y sideróforos (Dror et al., 2020). Los NRPS presentaron los conteos de BGCs más abundantes en todos los tratamientos, posiblemente porque junto a los policétidos son igualmente los BGCs más abundantes. Es importante resaltar que, aunque los NRPS se encontraban distribuidos de manera casi homogénea entre los tratamientos, el tratamiento RS-B, fue el que presentó mayores conteos. Estos resultados junto con el hecho de que, el conteo total de BGC se asemejaba al tratamiento RS-MMO podría contribuir a entender el por qué no se encontraron grandes diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en la incidencia de patógenos.

Por último, las bacteriocinas péptidos sintetizados ribosomalmente con un estrecho margen de acción (Holtsmark et al., 2008), pueden reducir la incidencia o severidad de enfermedades en plantas por su acción bactericida y/o bacteriostática, inhibiendo el crecimiento de patógenos (Subramanian & Smith, 2015), promoviendo el potencial de protección contra fitopatógenos en este tratamiento.

### **Análisis de genes relacionados con el ciclo de carbono**

El análisis del potencial funcional estuvo dirigido con gran interés en la identificación de los genes que codifican para enzimas degradadoras de carbohidratos (**CAZy**) reconocidos por su capacidad para sintetizar, pero especialmente para degradar carbohidratos y glicoconjugados. En este estudio se identificaron todas las seis familias en cada uno de los

tratamientos a través del tiempo, con una alta diversidad de cada una de esas familias. La más enriquecida de las familias fueron las glicosil hidrolasas (GH). Ahora bien, algunos genes codifican para enzimas que están involucradas en procesos enzimáticos similares, lo que contribuye a la redundancia funcional de la comunidad (Choi et al., 2018). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren un alto nivel de redundancia en degradación de carbono, soportado por la cantidad de las diferentes enzimas activas sobre carbohidratos que fueron identificadas en este estudio.

Ahora bien, el número de familias relacionadas con degradación fue mayor (162), en comparación con el número de familias de genes relacionados con síntesis de carbohidratos (47). Esto indica que las comunidades microbianas asociadas a los tratamientos están especializadas en la hidrólisis de uniones glicosídicas, es decir están enfocadas en la degradación de la materia orgánica presente.

En el análisis se evaluó todos los tratamientos si tener en cuenta el tiempo de muestreo, donde el tratamiento RS-IMO presentó una mayor abundancia de CBM5 (Figura 3-23), un módulo de unión a carbohidratos con gran afinidad a la celulosa cristalina y especialmente a la quitina, que incrementa la eficiencia de las enzimas para unirse a estos sustratos (Guillén et al., 2010; Mekasha et al., 2020). Mekasha et al., (2020) demostró que este módulo tiene una mayor afinidad por la  $\alpha$ -quitina en comparación a  $\beta$ -quitina, lo cual le permite a microorganismos como *Actinomycetales* (de Vries, 2018), una mayor afinidad por el sustrato natural. Esto sugiere que, particularmente en este tratamiento puede haber un mayor efecto de degradación de compuesto quitinolíticos mediado por la presencia de CBM5.

Cuando se analizó solo los tiempos de muestreo (Figura 3-23), la GH92 presentó una mayor abundancia en los tiempos inicial y de degradación en comparación a tiempo final. Esta GH está involucrada en la degradación de hemicelulosa ya que posee actividad  $\alpha$ -manosidasa (EC3.2.1.123). Así mismo la GH92 ha sido previamente reportada en un estudio de degradación de tamo de trigo asociada a la presencia de *Bacteroidetes*, especialmente a *Sphingobacterium* (Jiménez et al., 2015). Esta enzima posee la capacidad de hidrolizar polisacáridos de residuos vegetales agrícolas (Jiménez et al., 2016). Estos resultados sugieren que, durante estos dos tiempos de muestreo, se tiene el potencial de degradar material lignocelulósico, lo cual estaría acorde con los resultados encontrados en

las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de hemicelulosa, a pesar de que esta actividad en particular ( $\alpha$ -manosidasa) no fue evaluada, las actividades hemicelulolíticas si presentaron una alta actividad en comparación con la actividad celulolítica.

Por otra parte, las GH que se encontraron enriquecidas en el tiempo de degradación fueron GH113 y GH135 que poseen actividad  $\beta$ -mananasa (EC [3.2.1.78](#)),  $\alpha$ -1,4-galactosaminogalactano hidrolasa (EC [3.2.1.-](#)). Otras GH identificadas con mayor abundancia en este tiempo fueron la GH 51 posee actividad endoglucanasa (EC [3.2.1.4](#)); endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC [3.2.1.8](#));  $\beta$ -xilosidasas (EC [3.2.1.37](#));  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC [3.2.1.55](#)); liquenasa / endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanasas (EC [3.2.1.73](#)) y la GH116 actividad  $\beta$ -glucosidasas (EC [3.2.1.21](#));  $\beta$ -xylosidasas (EC [3.2.1.37](#));  $\beta$ -glucosidasas/ $\beta$ -glucosilceramidasa ácida (EC [3.2.1.45](#));  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (EC [3.2.1.52](#)) (The CAZyPedia Consortium et al., 2018). Estas enzimas hidrolíticas actúan sobre la hemicelulosa, especialmente sobre xiloglucanos o xilanos (de Souza, 2013) y trabajan de manera cooperativa para romper glucoarabinoxilanos, uno de los mayores componentes de plantas monocotiledóneas (Wongwilaiwalin et al., 2013), que trabajan en la degradación de lignocelulosa (Alvira et al., 2011). Esto indica que en esta etapa se cuenta con todo el arsenal genético para la producción de enzimas que intervienen en el proceso de degradación del TA.

El análisis de los tratamientos a través del tiempo señaló diferencias estadísticas significativas, pero para cada tratamiento los resultados son diferentes. Las enzimas que difieren en el caso del tratamiento RS-MMO ([Figura 3-25](#)) fueron la GH102 y la GH16 que actúan sobre un amplio rango de polisacáridos complejos, especialmente xiloglucanos (Viborg et al., 2019) y GT30 involucrada en la biosíntesis de oligo y polisacáridos y glicoconjugados (Breton et al., 2006). Estas familias activas sobre carbohidratos presentaron una mayor abundancia en tiempo de degradación. Mientras que la GH130 principalmente con actividad  $\beta$ -1,2-mannosidasa (EC [3.2.1.-](#)) y la GH27 con actividad principalmente  $\alpha$ -galactosidasas (EC [3.2.1.22](#)) presentaron mayor abundancia en tiempo inicial. Esto sugiere que en tiempo de degradación el potencial enzimático está dirigido a la degradación de polisacáridos complejos, especialmente aquellos que son encontrados en las paredes celulares de las plantas.

El tratamiento RS-IMO (Figura 3-26) presentó mayores abundancias en las familias AA12 (actividad oxido-reductasa), GH148 ( $\beta$ -1,3-glucanasa) y PL9 (pectato liasa EC 4.2.2.2) en los tiempos inicial y de degradación. El potencial enzimático de este tratamiento actúa sobre polisacáridos de la pared celular de plantas, como la pectina; particularmente la pectato liasa es producida por hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Fusarium* y bacterias como *Clostridium* y *Streptomyces* (Sutherland, 1995). Las PL rompen enlaces glicosídicos en polisacáridos ácidos (Linhardt et al., 1987), mientras las AA incluye enzimas redox que actúan en conjunto con las GH, PL y CE y les ayuda a obtener acceso a los carbohidratos que hacen parte de la pared celular de plantas, colaborando de manera sinérgica en su degradación. En este caso la AA12 es una deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona y es producida principalmente por bacterias Gram negativas (Characterization & Turbe-doan, 2019).

El tratamiento RS-B presentó mayores diferencias a través de tiempo (Figura 3-27), con una alta actividad celu y hemicelulasa; al igual que el tratamiento RS-M con diferencias en enzimas degradadoras de hemicelulosas en tiempo de degradación.

Para nuestro conocimiento este es el primer análisis de suelos agrícolas en campo aplicando los cuatro tratamientos aquí propuestos que revelan la variedad de genes relacionados con la degradación de materia orgánica. Los resultados aquí expuestos ponen de manifiesto el amplio potencial funcional presente en estos suelos, y que cada uno de los tratamientos aplicados ejerce un efecto diferente sobre la comunidad microbiana evidenciado en el potencial de las enzimas relacionadas con la liberación de azúcares a partir de oligosacáridos presentes en el TA.

Adicionalmente, cuando se identifican las funciones enzimáticas asociadas a cada tratamiento en los diferentes tiempos de muestreo se puede hablar de redundancia funcional, puesto que algunos de los genes codifican para enzimas cumplen la misma función. Adicionalmente, el potencial metabólico presente en cada tratamiento refleja la importancia de estas proteínas en la degradación (deconstrucción) de la biomasa de residuos vegetales.

Es importante mencionar que la gran mayoría de los genes estaban relacionados con la degradación de hemicelulosa en comparación a la celulosa. Kont et al., (2013) en un estudio *in vitro* encontró que en la fracción líquida de tamo de trigo pre tratado de manera

hidrotermal, los oligosacáridos fueron fuertes inhibidores de la celulasa incluso, llegando a ser 100 veces inhibidor que la presencia de celobiosa (Kont et al., 2013). Esto también se vio reflejado en los análisis de las actividades enzimáticas, las cuales presentaron mayores valores cuando se evaluaron las actividades hemicelulolíticas en comparación a las celulolíticas. Y aunque sí se encontraron genes involucrados en la degradación de celulosa, cabe recordar que la identificación de genes no refleja los miembros activos de la comunidad, o la producción de las proteínas en la presencia del sustrato.

En cuanto a los otros procesos de interés que incluyen **metanogénesis y metanotrofia** (Figura 3-29), se puede decir que los microorganismos metanógenos desempeñan un rol fundamental en el ciclo de carbono (Serrano-Silva et al., 2014) y son clasificados de acuerdo al sustrato que empleen como: hidrogenotrofos, formatotrofos, acetotrofos, metilotrofos y alcoholotrofos (Serrano-Silva et al., 2014). A través del análisis metagenómico fueron identificadas tres vías principales de producción de metano, hidrogenotrofa, metilotrofa y acetotrofa o acetoclástica.

Los metanógenos identificados a través del análisis del 16S rRNA como los *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanosmicrobiales* y *Methanosarcinales* encontrados en este estudio, dependen de otros microorganismos que les proporcionen sustratos y condiciones de reducción adecuadas, como por ejemplo amonio, para emplearlo como fuente de nitrógeno.

Es importante resaltar que, así como se encontraron las vías de metanogénesis también se encontró la vía de la metanotrofia (Figura 3-29). Ahora bien, en el caso del tratamiento RS-MMO los metanotrofos tipo I, *Methyломomas* (*Gammaproteobacteria*) y tipo II *Methylocystis* (*Alfaproteobacteria*) se encontraban disminuidos a tiempo final.

Contrario a lo reportado en este estudio, Imchen et al., (2019), reportó un enriquecimiento de metanotrofos tipo I a medida que aumentaba la edad de las plantas y hasta el drenaje del agua en rizósfera de arroz; similar a lo encontrado por Pandit et al., (2016) en cultivos de arroz en la India. Posiblemente, debido a que estos eran suelos rizosférico mientras que los trabajados en este análisis fueron suelos de soporte. Adicionalmente, *Methyломomas* es capaz de fijar nitrógeno, pero debido a que en este estudio la cantidad de N adicionado como fertilizante fue bastante alto, posiblemente disminuyó la presencia de este microorganismo.

En el caso de *Methylocystis* un metanotrofo tipo II, los resultados coinciden con lo reportado por Imchen et al., (2019), quien tampoco encontró enriquecimiento hacia el final del cultivo. Posiblemente debido a la presencia del amonio ya que este sustrato los emplean tanto los metanotrofos como los nitrificadores y compiten por el mismo (Reay & Nedwell, 2004). De igual forma, los productos intermedios del proceso de nitrificación (hidroxilamina y nitrito) pueden inhibir la presencia de *Methylocystis*.

La estrecha relación existente entre el C y el N generó la inquietud acerca del potencial funcional de la comunidad microbiana enfocada en este ciclo, debido adicionalmente a que este nutriente desempeña un papel fundamental en la composición microbiana especialmente en suelos agrícolas (Fierer et al., 2012). En cuanto a la identificación de la **función potencial** de la comunidad microbiana, 59 genes fueron asignados a las rutas bioquímicas de fijación de nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, reducción asimilatoria y desasimilatoria de nitrato. Sin embargo, los resultados no reflejaron diferencias en el potencial funcional de la comunidad.

De los genes detectados, los que se encontraban en mayor abundancia estaban relacionados con metabolismo de aminoácidos, seguidos por los genes *nar* como son *narK*, *narG*, *narH*, *nxB* (homólogo a *narH*) pertenecientes a la ruta de la desnitrificación (reducción de nitrato) (Kuypers et al., 2018), así como también fue detectado *nasB* una nitrito reductasa asimilatoria (Lin et al., 1993) y un transportador de nitrato/nitrito, esencial para el transporte de nitrito del suelo a la planta (Kotur et al., 2013). La mayor abundancia de estos genes transportadores puede estar relacionado con la alta disponibilidad de N inorgánico, representado por la alta concentración de fertilizantes nitrogenados aplicados al cultivo.

A pesar de que no se encontraron diferencias entre los tratamientos en cada tiempo de muestreo o a través del tiempo, las actividades enzimáticas como proteasa y ureasa mostraron que estas enzimas respondieron de manera diferencial a los tratamientos tal como lo muestra su respuesta en el tiempo de degradación, y en el tiempo de floración la ureasa. Esto puede ser debido a que las enzimas pueden quedar atrapadas en el suelo, protegidas y en el momento en que las condiciones sean favorables para ser funcionales (Nannipieri et al., 2017).

Por último, en el ciclo de fósforo, el interés inicial iba dirigido a identificar el potencial funcional de los genes que codifican para la fosfatasa ácida, alcalina y la fitasa. Sin embargo, estos genes presentaron una baja abundancia en general y en todos los tratamientos el gen de la fosfatasa alcalina siempre presentó más bajas abundancias que el gen de la fosfatasa ácida. Este mismo comportamiento fue evidenciado igualmente durante la evaluación de las actividades enzimáticas ([Figura 3-37](#); [Figura 3-38](#)), incluso evidenciando la disminución en la abundancia de genes a través el tiempo

Llama la atención que, de los 30 genes del ciclo de fósforo detectados, las mayores abundancias correspondieron a un sistema de dos componentes, PhoR-PhoB que activa la transcripción de diversos genes involucrados en la captura y asimilación de fosfato (Dai et al., 2020). La mayoría de genes correspondieron a transportadores de fosfatos, los cuales revisten gran importancia, debido a que pueden asimilar P inorgánico en condiciones de alta o baja disponibilidad de P (Dai et al., 2020). La escases de los genes que codifican para las fosfatasas y fitasas, y el incremento en los transportadores de fosfato sugieren que el fósforo no estaba escaso y posiblemente estaban siendo favorecidos los procesos del ciclo de N, donde se necesita de grandes cantidades de fósforo tal como el metabolismo de aminoácidos (Nelkner et al., 2019), uno de los procesos más representados en el ciclo del nitrógeno.

#### **4.4 Objetivo 2: Determinar el efecto de la aplicación de una enmienda de carbono sobre las actividades enzimáticas asociada a algunas funciones del ciclo del C, N, y P en cultivos de arroz**

Merece la pena recordar que las evaluaciones enzimáticas se realizan sobre las enzimas extracelulares y las de fracción libre, puesto que la unida a células microbianas, son de difícil acceso (Mašínová et al., 2018). Sin embargo, esto permite realizar inferencias acerca del esfuerzo por obtener macro elementos como C, N y P a partir de fuentes orgánicas específicas (Rovira & Ramón Vallejo, 2002; Veres et al., 2015), estimulado por unos tratamientos asociados al manejo del TA por lo que pueden ser usadas como indicadores de cambios asociados con prácticas agrícolas y permiten dilucidar las funciones que se están desarrollando en el suelo (Acosta-Martínez et al., 2007) debido a que son altamente sensibles a cambios en el ecosistema (Gianfreda et al., 2005).

#### **4.4.1 Carbono**

Las enzimas asociadas a la descomposición en el ciclo de C en este estudio mostraron un incremento significativo en función del tiempo, sin estabilización en el momento de finalizar el ensayo, esto sugiere que el TA se encontraba aún en proceso de degradación con sustratos como la celulosa y hemicelulosa expuestos en la matriz del suelo. El incremento de estas actividades enzimáticas en el tiempo de floración, puede ser debida a que la incorporación de residuos de cultivo posterior a la degradación y en el momento de la preparación del campo para la siembra, suministra nutrientes (Bastida et al., 2017) a través de la disposición de C lábil (Schimel & Bennett, 2004) de esta manera incrementa la biomasa microbiana que se torna más activa en descomposición de la materia orgánica (Bowles et al., 2014; Ekenler & Tabatabai, 2003).

#### **Actividad enzimática $\beta$ -glucosidasa**

El análisis realizado permite identificar que en el segundo punto de muestreo (tiempo de degradación) al finalizar la etapa de 30 días de degradación se presentó una disminución de la actividad en todos los tratamientos. Esto muy probablemente pudo ser consecuencia de una gran producción de glucosa, como consecuencia de una gran actividad de degradación, ya que esta enzima es inhibida por altas concentraciones de este monómero (Zang et al., 2018).

En este mismo tiempo de muestreo, la actividad enzimática mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con presencia de microorganismos (RS-IMO, RS-MMO) siendo la actividad más alta en comparación a RS-M (Figura 3-30). Este resultado permite sugerir, que la aplicación de microorganismos estimula una mayor actividad enzimática acelerando el proceso de degradación del tamo de arroz bajo condiciones de campo.

Los resultados aquí presentados están en consonancia con los resultados reportados por Guo y col., (2018) quienes encontraron un incremento de las actividades enzimáticas como  $\beta$ -glucosidasa, con el aumento del proceso de descomposición del tamo, el cual fue bajo en las primeras etapas y alto en las etapas tardías. En otro estudio realizado por Draganova y col., (2019) en sistema de cámara controlado (100g en total de suelo) con tamo de trigo reportaron de igual manera, un aumento en la actividad enzimática a las 12 días posterior a la aplicación de los tratamientos que incluían diversas cepas de

*Trichoderma*, con disminución de la actividad a partir del día 20. Sin embargo, en este trabajo, aunque se reportó una disminución en el tiempo de degradación, contrario a los hallazgos de Draganova y col., la actividad continuó en aumento hasta el momento de la cosecha

### **Actividad enzimática celulasa**

La razón que podría explicar los resultados obtenidos en este estudio van en consonancia con el hecho de que la degradación de celulosa en suelo es un proceso lento con baja actividad en el suelo de soporte (Alef & Nannipieri, 1995; Schinner & von Mersi, 1990) y que depende de la concentración, localización y movilidad de las celulasas (Hayano 1986), así como de la concentración del sustrato, pH, temperatura, contenido de agua, material vegetal, estación y tipo de manejo agrícola (Sethi et al., 2013).

Cabe aclarar que aunque la mayoría de enzimas relacionadas con degradación del ciclo del C, y particularmente de celulosa son evaluadas, existen vías alternas para la degradación de este polímero, encontradas en reportes recientes de metatranscriptoma de suelo (Hesse et al., 2015; Žifčáková et al., 2017), esto podría explicar la baja actividad de la celulasa en general.

### **Actividad enzimática $\beta$ -xilosidasa**

El comportamiento de la actividad  $\beta$ -xilosidasa fue similar al comportamiento de la  $\beta$ -glucosidasa, con disminución en el segundo tiempo de muestreo y aumento en los tiempos posteriores (Figura 3-32). Es importante recalcar que, aunque el comportamiento es similar, la actividad  $\beta$ -xilosidasa es mucho mayor comenzando desde los 80  $\mu\text{PNPX}\cdot\text{gss}\cdot\text{h}^{-1}$  y sobrepasando los 150  $\mu\text{PNPX}\cdot\text{gss}\cdot\text{h}^{-1}$ , mientras la  $\beta$ -glucosidasa no supera los 20  $\mu\text{PNPX}\cdot\text{gss}\cdot\text{h}^{-1}$  como actividad máxima.

La disminución de la actividad en el segundo tiempo de muestreo sugiere que, la hemicelulosa (xilanos, mananos y glucomanos, xilobiosa y xilooligosacáridos, entre otros), se encuentra disponible posterior a este tiempo de muestreo, para ser degradada por las endo y exoxilanasas (Alef & Nannipieri, 1995; Schinner & von Mersi, 1990).

Las diferencias estadísticas que se presentaron en el tiempo de floración ( $P < 0,00$ ) para el tratamiento RS-M frente a los otros tratamientos, sugiere que para este tratamiento en

particular hay más sustrato disponible en este tiempo de muestreo, posiblemente como efecto de una degradación más lenta debido a la ausencia de MOs.

### **Actividad enzimática $\beta$ -galactosidasa**

El comportamiento de esta actividad enzimática es similar tanto a la  $\beta$ -glucosidasa, como a la  $\beta$ -xilosidasa. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativa para ninguno de los tiempos de muestreo (Figura 3-33), aunque sí un aumento desde floración y hacia el final del cultivo. En los procesos de descomposición de materia orgánica se observa una sinergia enzimática como respuesta al sustrato disponible, debido a las proporciones relativas de los diferentes compuestos en las diferentes tasas de degradación de los mismos (Fontaine *et. al.*, 2003), por lo que los picos de actividad de enzimas como la  $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$  galactosidasa relacionadas con descomposición de polímeros como la hemicelulosa, no se ven representados en los primeros tiempos del ensayo sino hacia el final del cultivo.

### **4.4.2 Fósforo**

El P se encuentra poco disponible para la planta. Sin embargo, a través del proceso de mineralización microbiana puede estar nuevamente disponible a través de diferentes fracciones de fosfatasa provenientes de bacterias, hongos y raíces de vegetales (Fraser *et al.*, 2015; Tarafdar *et al.*, 2001).

### **Actividad enzimática fosfatasa ácida**

La actividad de la fosfatasa ácida (Figura 3-37) presentó una tendencia generalizada de disminución gradual en el tiempo. Las diferencias estadísticas que se observaron en los diferentes tiempos de muestreo señalan un efecto de los tratamientos, como es el caso del tiempo de degradación, donde los tratamientos con cobertura (RS-MMO y RS-M) se logran diferenciar con una mayor actividad del tratamiento incorporado RS-IMO, con la más baja actividad. Sin embargo, en el momento de la floración, los tratamientos con microorganismos (RS-MMO y RS-IMO), presentaron una mayor actividad, sugiriendo una mayor tasa de mineralización en esos tratamientos.

A través del tiempo, se identificaron diferencias significativas, para todos los tratamientos, pasando de alrededor de 700 a cerca de 200  $\mu\text{g pNPP}\cdot\text{gss}\cdot\text{h}^{-1}$  en el punto inicial y final del

experimento respectivamente. Esta disminución en actividad obedece posiblemente a un incremento de P generado por la mineralización de P generado por la aplicación de microorganismos y quizá también debido a la aplicación de fertilizantes fosforados, posterior al segundo tiempo de muestreo, lo que inhibe la actividad de la enzima (Margalef et al., 2017).

### **Actividad fosfatasa alcalina**

La tendencia general de esta enzima es a mantener una actividad enzimática a través del tiempo para los tratamientos sin MO (Figura 3-38). Por otro lado, el tratamiento con RS-IMO, incrementó su actividad en el segundo tiempo de muestreo relacionado quizá con una mayor demanda de P por parte de los microorganismos en suelo los cuales necesita energía para el funcionamiento, crecimiento celular y para la degradación del TA. Finalmente, se presentó una disminución de la actividad en todos los tratamientos en el último tiempo de muestreo (cosecha), sugiriendo la biodisponibilidad del P en el sistema.

El comportamiento en el segundo tiempo de muestreo sugiere que la adición de materia orgánica y la aplicación de microorganismos al agroecosistema estimula esta actividad enzimática en el suelo. Esto es consecuente con el estudio de Sakurai y col., (2008), quienes reportaron que la actividad de la fosfatasa se incrementó con la presencia de materia orgánica y además se reduce con la fertilización inorgánica (Gianfreda et al., 2005; Sakurai et al., 2008), lo cual explica igualmente la reducción posterior al período de degradación, a partir del cual se comienza la fertilización química del cultivo.

El análisis de la actividad fosfatasa en suelo, permitió identificar una mayor actividad de la fosfatasa ácida en comparación a la alcalina. Esto posiblemente se debió a que esta enzima es producida tanto por microorganismos como por las plantas (Yadav & Tarafdar, 2001), las cuales liberaron la enzima al suelo y posteriormente se estabilizó en dicha matriz (suelo). Adicionalmente, merece mencionar que el pH del suelo bajo estudio, no favorece tanto esta última actividad, (Eivazi & Tabatabai, 1977). La actividad de estas enzimas indica que la incorporación del tamo al suelo incrementa la mineralización de P en el suelo.

## **4.4.3 Nitrógeno**

### **Actividad enzimática proteasa**

Teniendo en cuenta que cerca del 90% del N asociado a la superficie terrestre es de origen orgánico, la proteólisis es considerado un paso limitante en el proceso de mineralización de N en el ecosistema (Vranova et al., 2013). En este estudio, el hecho de que los tratamientos con aplicación de MO presentaron la actividad más alta en el tiempo de floración quizá obedece al hecho de la presencia de la cepa de *Bacillus pumilus* (IBUN02717), la cual posee actividad proteolítica generando aminoácidos y péptidos a partir del N orgánico presente en el TA (Cruz-Ramírez et al., 2017).

Una de las etapas en las cuales las plantas de arroz requieren mayor cantidad de N, es durante el macollamiento y la formación del primordio floral, lo que podría explicar el aumento de esta actividad en los cuatro tratamientos. Además el incremento de esta actividad, se correlaciona de forma positiva con el contenido de materia orgánica, como se ha evidenciado en suelos de cultivo de arroz de los departamentos del Tolima y Meta (Marentes et al., 2011; Vanegas et al., 2013).

### **Actividad enzimática ureasa**

La ureasa da cuenta del proceso de hidrólisis de urea a amonio (Tabatabai 1982). La urea representa solo una pequeña parte del N orgánico del suelo (Nannipieri et al., 2017). Sin embargo, en este estudio en particular representa una gran parte de la fertilización aplicada.

Todos los tratamientos con excepción del tratamiento RS-MMO parecen tener un patrón similar en esta actividad enzimática, con una disminución significativa de la actividad en el tiempo de degradación, aumento significativo en el tiempo de floración y disminución en tiempo final, excepto para el tratamiento RS-M (Figura 3-35). Estos resultados coinciden con la cinética de la enzima en suelos arroceros, de acuerdo a estudios previos realizados sobre este cultivo, donde se reporta un aumento de la enzima, correspondiente a la etapa de llenado del grano y una posterior disminución en la etapa de maduración (Hussain et al., 2012).

En el segundo tiempo de muestreo se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, a pesar de que no había sido aplicado el esquema de fertilización, esto sugiere que la actividad de la enzima se debe al proceso natural de mineralización

para la obtención de N a partir de la materia orgánica debido posiblemente al alto radio C:N. En el tiempo de degradación, el tratamiento RS-M, se distingue de los demás por tener un valor más bajo de actividad enzimática, debido probablemente a que este tratamiento no fue inoculado con el consorcio microbiano. Esto hace suponer que la actividad enzimática en este tratamiento proviene exclusivamente de los microorganismos propios del ecosistema. Esto estaría indicando que hay una clara diferencia entre adicionar o no MOs. Sin embargo, se ha reportado también que la actividad de esta enzima está fuertemente correlacionada con el contenido de carbón orgánico en el suelo (Sahrawat, 2009). Y dado que este tratamiento presentó las más bajas actividades enzimáticas determinadas para el ciclo de C en el mismo tiempo de muestreo, los resultados están en consonancia con lo reportado por Sahrawat, (2009).

Para el tercer tiempo de muestreo, ya se había iniciado el esquema de fertilización nitrogenada, el cual estaba basado en la aplicación de urea (Estiu & Merz, 2004), esto explicaría el aumento de la actividad en todos los tratamientos, sin embargo, esto no sucedió para el tratamiento RS-MMO. Se hace necesario mencionar que los tratamientos RS-IMO y RS-B, los cuales fueron incorporados de manera temprana, presentaron un comportamiento similar durante los tiempos de muestreo posteriores a la incorporación. Esto hace suponer que la incorporación permitió liberar mayor cantidad de hidrolizados proteicos a partir de los compuestos orgánicos para la enzima ureasa. Estos resultados sugieren también que hay un efecto de la incorporación temprana del tamo sobre la actividad enzimática.

En general los bajos niveles de actividad enzimática se deben posiblemente al pH ácido del suelo, puesto que la enzima al tener una estructura proteica está sujeta a diferentes estados de ionización que dependen del pH tanto para su sitio de unión como para el sitio catalítico y si están presentes muchos hidrogeniones la enzima se inactiva (Frankenberger & Bingham, 1982).

### **Actividad de la enzima nitrogenasa**

Para la actividad nitrogenasa ([Figura 3-36](#)), se observa una tendencia de disminución de la actividad de la enzima para todos los tratamientos en el tiempo de degradación y floración manteniendo luego estable su actividad hacia el tiempo final de muestreo. Esta tendencia puede relacionarse con las características de activación de la enzima, la cual

requiere altos niveles de glucosa o fuentes de carbono, puesto que es una reacción con alta demanda energética (Burris, 1991). Este resultado permite pensar que en el tiempo inicial de muestreo cuando la actividad nitrogenasa está más alta, la degradación de la materia orgánica del cultivo anterior se debe encontrar en un proceso de maduración con altos niveles de carbono lábil que permiten sustentar energéticamente la actividad de la enzima, como lo sugieren Tanaka y col., (2006), que encontraron un incremento en la fijación de N al aplicar tamo de arroz en el suelo.

Para el tiempo de floración el nivel de esta enzima se prevé esté bajo, ya que las repetidas aplicaciones de fertilizantes nitrogenados suplen la demanda de N para las plantas y está lo suficientemente disponible para los microorganismos, por lo que el proceso de fijación del N no es necesario, este efecto se debe a que la actividad de la enzima nitrogenasa es inhibida por la presencia de  $\text{NH}_4^+$  en el suelo (Shrestha y Maskey 2005; Tanaka et al 2006). Este proceso de regulación de la nitrogenasa es reversible, por lo que una vez en ausencia del ion  $\text{NH}_4^+$  se induce nuevamente la expresión de la nitrogenasa (Hartmann et al 1986).

En este contexto, una vez el N inorgánico proveniente de la fertilización es usado por las plantas se ha perdido del sistema suelo, ya sea por lixiviación o volatilización, la enzima es requerida nuevamente para suplir las necesidades de los microorganismos y los requerimientos de la planta en menor medida, es por esto por lo que hacia el final del cultivo se estabiliza nuevamente la enzima o incluso presenta un leve incremento como es el caso para los tratamientos RS-B y RS-IMO.

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos posiblemente está relacionada con que el manejo de fertilización nitrogenada en todo el cultivo fue igual en todos los tratamientos, generando un proceso de homogenización en la regulación de esta actividad enzimática, ya que la cantidad de N disponible en el sistema por fertilización fue bastante alta llegando a los  $229 \text{ Kg. ha}^{-1}$ . Es importante aclarar que los valores altos de fertilización nitrogenada  $200 \text{ Kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  son normales para ese tipo de suelos en el Tolima (G. Garcés, comunicación personal, 17 de octubre de 2017).

### **4.5 Objetivo 3: Seleccionar y evaluar genes indicadores del efecto de la incorporación del tamo sobre la estructura y función de la comunidad microbiana asociada a los ciclos de C, N, y P en un cultivo comercial de arroz**

De acuerdo a los resultados obtenidos, de los genes de interés en los diferentes ciclos de cultivo, el ciclo del N fue el que permitió la cuantificación absoluta de tres genes de interés.

#### **Fijación de nitrógeno**

Se sabe que la fijación biológica de N es un proceso que es afectado por la fertilización inorgánica. Se esperaba entonces que el número de copias de genes *nifH* estuviera más aumentado en el tiempo de degradación (sin aplicación de fertilizantes) y disminuido en el tiempo final. Contrario a lo que se esperaba, el aumento no se identificó en ningún tiempo en particular. Sin embargo, cuando se evaluó cada uno de los tratamientos a través del tiempo, se presentaron diferencias estadísticas significativas en el tratamiento RS-IMO, con un incremento desde tiempo inicial a tiempo final.

Estos resultados están acordes con lo que se esperaba, ya que, en el segundo tiempo de muestreo, probablemente el proceso de degradación del tamo venía ocurriendo, liberando nutrientes, específicamente C, representado en moléculas simples que soportan el crecimiento de los microorganismos. Esto difiere sin embargo de lo que se encontró en la determinación de las actividades enzimáticas, puesto que, a pesar del aumento del número de copias de los genes, la actividad no presentó diferencias significativas, muy probablemente debido a la alta concentración de N inorgánico aplicado como fertilizante. Lo cual conduce a un incremento diferencial en las poblaciones de fijadores biológicos de nitrógeno. Merece mencionar que estas diferencias no fueron evidenciadas ni por el estudio de metataxonómica ni por la metagenómica.

#### **Nitrificación**

La nitrificación es un proceso clave, el cual se lleva a cabo en dos fases, la primera la conversión de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y la segunda de nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). La primera fase es considerada limitante del proceso (Kumwimba & Meng, 2019) y en ella se encuentran involucrados las bacterias oxidadoras de amonio (AOB) y las arqueas

oxidadoras de amonio (AOA), mediante el gen que codifica para la enzima clave “*amo*”, cuyo gen funcional es la subunidad *amoA* el cual ha sido empleado como biomarcador para evaluar la diversidad y abundancia de las AOB y AOA (Prosser & Nicol, 2012). Las AOA presentan mayor afinidad por el sustrato y por utilizar carbono orgánico, mientras las AOB son autótrofos obligados (Kumwimba & Meng, 2019),

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio en el número de copias del gen *amoA* de AOB (Figura 3-39), no se encontraron diferencias estadísticas significativas en cada uno de los tiempos, ni entre los tratamientos a través del tiempo. La escasa variación en el número de copias se puede explicar por la alta entrada de materia orgánica al suelo ya sea a través del tamo o de las raíces, con alto contenido de materia orgánica en suelo y altas concentraciones de N (Blaud et al., 2017), los cuales junto al pH son capaces de modificar la estructura de la comunidad de las AOB. Merece mencionar además que el número de copias del gen *amoA* siempre fue menor en comparación a las AOA (Figura 3-40). La otra alternativa que ayuda a explicar este comportamiento es que tanto AOB y AOA a menudo co-existen en el mismo ambiente y se ven influenciadas por lo mencionado con anterioridad y adicionalmente a los agregados, y la alta tasa de fertilización (Li et al., 2018).

El hecho de que las AOB se encuentren en menor número de copias que las AOA coincide con lo reportado por (Nicol et al., 2008). Por otra parte, Banning et al., (2015), reportó que en suelos agrícolas semiáridos el número de copias de AOA fue cuatro veces menor que la de AOB en una profundidad de 0-10 cm. Mientras Jia & Conrad (2009) reportaron en suelos agrícolas neutrales fertilizados, que aunque haya menor número de copias de gen de las AOB, son ellas las que lideran la oxidación de amonio, mientras en suelos neutrales o alcalinos no fertilizados dominan las AOA (Zhang et al., 2010). En el presente estudio, los hallazgos sugieren que las AOA estarían liderando el proceso de nitrificación en suelos arroceros tal como lo demuestra Jiang et al., (2015) en su estudio.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Este estudio provee información acerca de la variación tanto en composición como variación funcional de las diferentes estrategias de tamo diseñadas a lo largo de un estudio longitudinal.

- Las estrategias de manejo del TA evaluadas en este trabajo y bajo las condiciones de este estudio, no mostraron un efecto significativo entre las variables físico-químicas evaluadas con excepción de una disminución en el pH en el tratamiento RS-M.
- En el tratamiento RS-M, la ausencia de microorganismos retrasa la degradación del tamo, generando un proceso sucesional diferente a los otros tratamientos, lo que podría explicar la disminución en el pH, que a su vez está relacionado con la disminución en la productividad del cultivo.
- Las estrategias alternativas de manejo de TA empleadas en este estudio no afectan el estatus fitosanitario del cultivo para la disposición final del tamo de arroz.
- Los tratamientos de manejo TA tienen un efecto sobre la estructura de la comunidad microbiana en la rizósfera al momento de floración. Diferenciando la composición de la comunidad bacteriana de la rizósfera entre los tratamientos dejados en cobertura, frente a los tratamientos incorporados de manera temprana.
- La comunidad fúngica rizosférica es influenciada por aplicación de TA (incorporado o en cobertura) y de microorganismos.
- No hubo un efecto de los tratamientos en la estructura de la comunidad microbiana en el suelo de soporte desde la preparación del terreno hasta el momento de la pre-siembra. Sin embargo, si se presentaron diferencias entre estos tiempos y el momento de la cosecha, excepto para el tratamiento RS-M.

- Los genes identificados en las comunidades de suelo de soporte que codifican para enzimas que actúan sobre carbohidratos, sugieren un mayor potencial de degradación de hemicelulosa en todos los tratamientos particularmente para el tratamiento RS-MMO sugiriendo que la aplicación del inóculo microbiano contribuye a la degradación del TA.
- Las actividades enzimáticas son un buen indicador del efecto de los tratamientos del tamo de arroz sobre la actividad y función de las comunidades microbianas.
- Las actividades enzimáticas de los ciclos del P (fosfatasa ácida y alcalina) y del N (ureasa, proteasa), mostraron un efecto positivo de la aplicación del inóculo de microorganismos en la mineralización del tamo de arroz.
- Las actividades enzimáticas del ciclo de C ( $\beta$ -glucosidasa, celulasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\beta$ -galactosidasa), sugieren que la aplicación de microorganismos en los tratamientos RS-MMO y RS-IMO incrementa la actividad enzimática sugiriendo un mayor proceso de degradación del tamo.
- Los genes seleccionados para identificar marcadores de los ciclos de C, N y P por qPCR, amplificaron secuencias inespecíficas diferentes a las esperadas, lo cual dificultó la identificación de los marcadores en el estudio.
- El análisis del gen *amoA*, sugiere que la población predominante en el suelo de soporte del cultivo del arroz corresponde al grupo de las arqueas particularmente para esta función.

## 5.2 Recomendaciones

De acuerdo con las conclusiones de este estudio se realizan las siguientes recomendaciones:

- De las diferentes estrategias de manejo del tamo de arroz se recomienda emplear el tamo de arroz como cobertura (RS-MMO) o tamo de arroz incorporado al suelo (RS-IMO), ambos con aplicación de microorganismos que aceleren y mejoren la degradación del tamo de arroz.
- Se recomienda el uso de las actividades enzimáticas como biomarcadores de la actividad y función de la comunidad microbiana asociadas al suelo de soporte en

cultivo de arroz, debido a su sensibilidad y eficiencia en identificar cambios entre las diferentes estrategias de manejo, además de ser una opción económica.

- Se recomienda realizar un estudio que incluya varios puntos del muestreo durante el período de degradación (33 días), con el fin de identificar cambios tempranos tanto en estructura como en función de la comunidad microbiana, durante las etapas iniciales de la degradación.
- Debido a las diferencias encontradas en la comunidad microbiana de la rizósfera en floración, se recomienda realizar un análisis de las comunidades microbianas que incluya otros puntos de muestreo en este tiempo y compararlo con suelo de soporte.



## Anexo A. Número de accesión de las muestras en MG-RAST

**Tabla:** Listado de los números de accesión de cada una de la muestra de secuenciación *shotgun* para los tiempos inicial, degradación y final.

	Muestras	Número de accesión en MG-RAST
Tiempo inicial	<a href="#">T1P1 T0 AGCGATAG TATAGCCT L001 R</a>	<a href="#">mgs628308</a>
	<a href="#">T1P2 T0 AGCGATAG ATAGAGGC L001 R</a>	<a href="#">mgs628311</a>
	<a href="#">T1P3 T0 AGCGATAG CCTATCCT L001 R</a>	<a href="#">mgs628314</a>
	<a href="#">T2P1 T0 AGCGATAG GGCTCTGA L001 R</a>	<a href="#">mgs628317</a>
	<a href="#">T2P2 T0 AGCGATAG AGGCGAAG L001 R</a>	<a href="#">mgs628320</a>
	<a href="#">T2P4 T0 AGCGATAG TAATCTTA L001 R</a>	<a href="#">mgs628323</a>
	<a href="#">T3P1 T0 AGCGATAG CAGGACGT L002 R</a>	<a href="#">mgs628326</a>
	<a href="#">T3P3 T0 AGCGATAG GACTGAC L002 R</a>	<a href="#">mgs628635</a>
	<a href="#">T3P4 T0 TCTCGCGC TATAGCCT L002 R</a>	<a href="#">mgs628329</a>
	<a href="#">T4P1 T0 TCTCGCGC ATAGAGGC L002 R</a>	<a href="#">mgs628332</a>
	<a href="#">T4P2 T0 TCTCGCGC CCTATCCT L002 R</a>	<a href="#">mgs628335</a>
	<a href="#">T4P4 T0 TCTCGCGC GGCTCTGA L002 R</a>	<a href="#">mgs628338</a>
Tiempo degradación	<a href="#">T1P1 T1 TCTCGCGC AGGCGAAG L003 R</a>	<a href="#">mgs628341</a>
	<a href="#">T1P2 T1 TCTCGCGC TAATCTTA L003 R</a>	<a href="#">mgs628344</a>
	<a href="#">T1P3 T1 TCTCGCGC CAGGACGT L003 R</a>	<a href="#">mgs628347</a>
	<a href="#">T2P1 T1 TCTCGCGC GACTGAC L003 R</a>	<a href="#">mgs628350</a>
	<a href="#">T2P2 T1 TCCGCGAA TATAGCCT L003 R</a>	<a href="#">mgs628353</a>
	<a href="#">T2P4 T1 TCCGCGAA ATAGAGGC L003 R</a>	<a href="#">mgs628356</a>
	<a href="#">T3P1 T1 TCCGCGAA CCTATCCT L004 R</a>	<a href="#">mgs628359</a>
	<a href="#">T3P3 T1 TCCGCGAA GGCTCTGA L004 R</a>	<a href="#">mgs628638</a>
	<a href="#">T3P4 T1 TCCGCGAA AGGCGAAG L004 R</a>	<a href="#">mgs628362</a>
	<a href="#">T4P1 T1 TCCGCGAA TAATCTTA L004 R</a>	<a href="#">mgs628365</a>
	<a href="#">T4P2 T1 TCCGCGAA CAGGACGT L004 R</a>	<a href="#">mgs628368</a>
	<a href="#">T4P4 T1 TCCGCGAA GACTGAC L004 R</a>	<a href="#">mgs628371</a>
Tiempo final	<a href="#">T1P1 T3 CGGCTATG TATAGCCT L005 R</a>	<a href="#">mgs628374</a>
	<a href="#">T1P2 T3 CGGCTATG ATAGAGGC L005 R</a>	<a href="#">mgs628377</a>
	<a href="#">T1P3 T3 CGGCTATG CCTATCCT L005 R</a>	<a href="#">mgs628380</a>
	<a href="#">T2P1 T3 CGGCTATG GGCTCTGA L005 R</a>	<a href="#">mgs628383</a>
	<a href="#">T2P2 T3 CGGCTATG AGGCGAAG L005 R</a>	<a href="#">mgs628386</a>
	<a href="#">T2P4 T3 CGGCTATG TAATCTTA L005 R</a>	<a href="#">mgs628389</a>
	<a href="#">T3P1 T3 CGGCTATG CAGGACGT L006 R</a>	<a href="#">mgs628392</a>
	<a href="#">T3P3 T3 CGGCTATG GACTGAC L006 R</a>	<a href="#">mgs628395</a>
	<a href="#">T3P4 T3 GAGATTCC CCTATCCT L006 R</a>	<a href="#">mgs628398</a>
	<a href="#">T4P1 T3 GAGATTCC GGCTCTGA L006 R</a>	<a href="#">mgs628320</a>
	<a href="#">T4P2 T3 GAGATTCC AGGCGAAG L006 R</a>	<a href="#">mgs628404</a>
	<a href="#">T4P4 T3 GAGATTCC TAATCTTA L006 R</a>	<a href="#">mgs628407</a>

## Anexo B. Listado de cebadores

**Tabla:** Listado de genes pertenecientes a cada uno de los ciclos biogeoquímicos de interés que se analizaron durante la investigación y que finalmente no fue posible obtener un clon correspondiente. En el listado se encuentran los ciclos biogeoquímicos y se relaciona el proceso en el que se encuentra involucrado cada gen, el nombre del cebador, la secuencia y la longitud en pares de bases (pb).

Ciclo biogeoquímico	Proceso	Gen	Sentido	Cebador	Secuencia	Longitud	
Nitrógeno	Nitrificación	<i>amo</i>	Forward	amoA19F	<i>STA ATG GTC TGG CTT AGA CG</i>	624 bp	
			Reverse	crenamoA616r48x	<i>GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT</i>		
			Forward	amoA-1F	<i>GGG GTT TCT ACT GGT GGT</i>	490 bp	
			Reverse	amoA2R-TC	<i>CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC</i>		
	Fijación	<i>nifH</i>	Forward	FGPH19	<i>TAC GGC AAR GGT GGN ATH G</i>	452 bp	
			Reverse	PolR	<i>ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA</i>		
	Denitrificación	<i>nosZ</i>	Forward	nosZ2F	<i>AGA GTT TGA TCMTGG CTC AG</i>	266 bp	
			Reverse	nosZ2R	<i>TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T</i>		
		<i>nirK</i>	Forward	Cooper 583F	<i>TCA TGG TGC TGC CGC GKG ACG G</i>	348 bp	
			Reverse	Cooper 909R	<i>GAA CTT GCC GGT PGC CCA GAC</i>		
		<i>narG</i>	Forward	narG 1960m2f	<i>TA(CT) GT(GC) GGG CAG GA(AG) AAA CTG</i>	110 bp	
			Reverse	narG 2050m2r	<i>CGT AGA AGA AGC TGG TGC TGT T</i>		
	Mineralización	<i>ureC</i>	Forward	ureC-F	<i>AAG STS CAC GAG GAC TGG GG</i>	317 bp	
			Reverse	ureC-R	<i>AGG TGG TGG CAS ACC ATS AGC AT</i>		
		<i>ureC</i>	Forward	ureC-QRT-F	<i>TTC ACA CCT TCC ACA CCG AA</i>		
			Reverse	ureC-QRT-P	<i>CGG TGG ACA CGC ACC AGA TAT CT</i>		
	Denitrificación	<i>nirK</i>	Forward	nirK-1F	<i>GGM ATG GTK CCS TGG CA</i>	208 bp	
			Reverse	nirK-1R	<i>GCC TCG ATC AGR TTR TGG</i>		
		<i>nosZ</i>	Forward	nosZ-1F	<i>WCS YTG TTC MTC GAC AGC CAG</i>	259 bp	
			Reverse	nosZ-1R	<i>ATG TCG ATC ARC TGV KCR TTY TC</i>		
			Forward	nosZ-2F	<i>CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT</i>	259 bp	
			Reverse	nosZ-2R	<i>CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA</i>		
		<i>narG</i>	Forward	narG w9-f	<i>MGN GGN TGY CCN MGN GGN GC</i>	174 bp	
			Reverse	narG w9-r	<i>ACR TCN GTY TGY TCN CCC CA</i>		
			Forward	narG t37-f	<i>CAY GGN GTN AAY TGY ACN GG</i>		
			Reverse	narG t37-r	<i>TAR TG GGC CCA NCC NCC NCC</i>		
	Forward		narG 2050f	<i>TAY GTS GGS CAR GAR AA</i>			
	Reverse		narG 2050r	<i>TTY TCR TAC CAB GTB GC</i>			
	Forward		narG 1960f	<i>TAY GTS GGG CAG GAR AAA CTG</i>			
	Reverse		narG 1960r	<i>CGT AGA AGA AGC TGG TGC TGT T</i>			
Forward	narG 1f		<i>TCG CCS ATY CCG GCS ATG TC</i>				
Reverse	narG 1r		<i>GAG TTG TAC CAG TCR GCS GAY TCS G</i>				
Fósforo	Mineralización	<i>B-propeller phytase</i>	Forward	BPP-F	<i>GAC GCA GCC GAY GAY CCN GCN IIN TGG</i>	160 - 200 bp	
			Reverse	BPP-R	<i>CAG GSC GCA NRT CLA CRT TRT T</i>		
		<i>alkaline phosphatase</i>	Forward	phoD-F733	<i>TGG GAY GAT CAY GAR GT</i>		350 bp
			Reverse	phoD-R1083	<i>CTG SGC SAK SAC RIT CCA</i>		
<i>alkaline phosphatase</i>	Forward	alps-F730	<i>CAG TGG GAC GAC CAG GAG GT</i>	400 bp			
	Reverse	alps-R1101	<i>GAG GCC GAC CGG CAT GTC G</i>				
Carbono	Metanotrofia	<i>pmoA</i>	Forward	m1_f	<i>GGN GAC TGG GAC TTC TGG</i>	420 bp	
			Reverse	m1_r	<i>GGT AAR GAC GTT GCN CCG G</i>		
	Metanogénesis	<i>mcrA</i>	Forward	ML-f modified	<i>GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA</i>	509 bp	
			Reverse	mcrA-R	<i>CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT</i>		

## Anexo C. Análisis físico-químicos de suelo de soporte

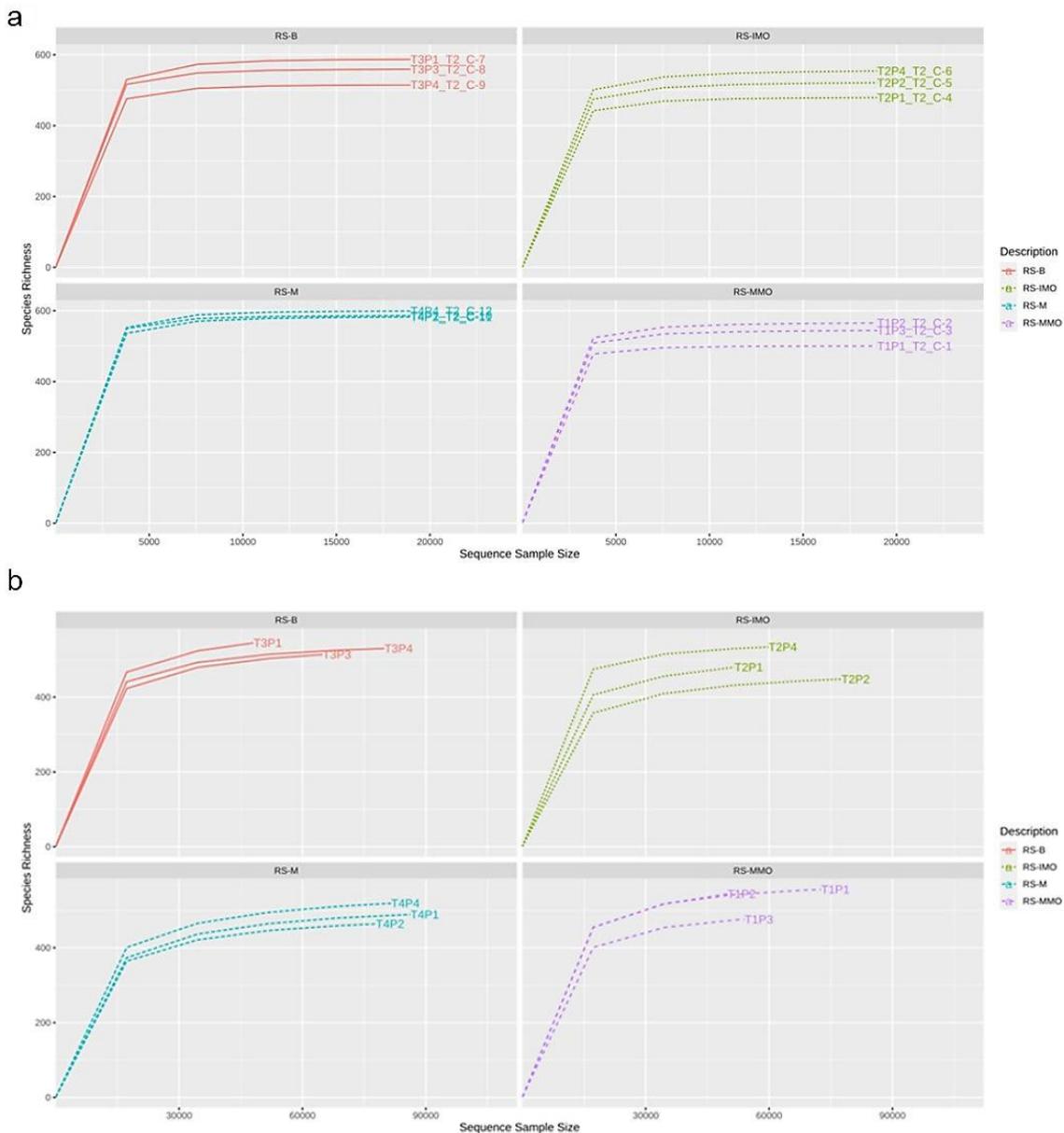
**Tabla:** Parámetros físico-químicas de los suelos del área de estudio en tiempo inicial y tiempo final. Los valores presentados para tiempo inicial corresponden al promedio de un duplicado (n=2) de toda el área de estudio y sus desviaciones estándar. Para el tiempo final los resultados corresponden a un triplicado (n=3) de cada uno de los tratamientos y sus respectivas desviaciones estándar. Las letras representan las diferencias significativas entre los tratamientos en los que se empleó ANOVA-Duncan ó Kruskal-Walis-Dunn con un  $P \leq 0.1$

Tratamientos	pH*	Ca	K	Mg	Na	Al	CICE	CO	N	P	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
		meq/100g						%		mg/Kg			
<b>Tiempo inicial</b>	5,24	4,8	0,19	0,84	0,27	0,36	6,5	0,44	0,05	40,3	2,2	16	
<b>Tiempo final</b>	RS-MMO	4,98 <b>a</b>	2,91	0,17	0,55	0,11	0,71	4,45	0,68	0,08	39,03	ND	ND
	RS-IMO	4,91 <b>ab</b>	2,79	0,19	0,56	0,1	0,73	4,36	0,71	0,08	48,45	ND	ND
	RS-B	4,91 <b>a</b>	3,02	0,18	0,54	0,09	0,72	4,54	0,69	0,03	47,08	ND	ND
	RS-M	4,69 <b>b</b>	2,81	0,17	0,47	0,09	0,84	4,37	0,71	0,01	45,6	ND	ND

\*señala diferencias significativas entre los tratamientos a un  $P \leq 0.1$

## Anexo D. Curvas de rarefacción de 16S rRNA e ITS en tiempo de floración

**Figura:** Gráficos de rarefacción basados en el número de ASV observados para bacterias (A) y de OTUs observados para hongos (B).



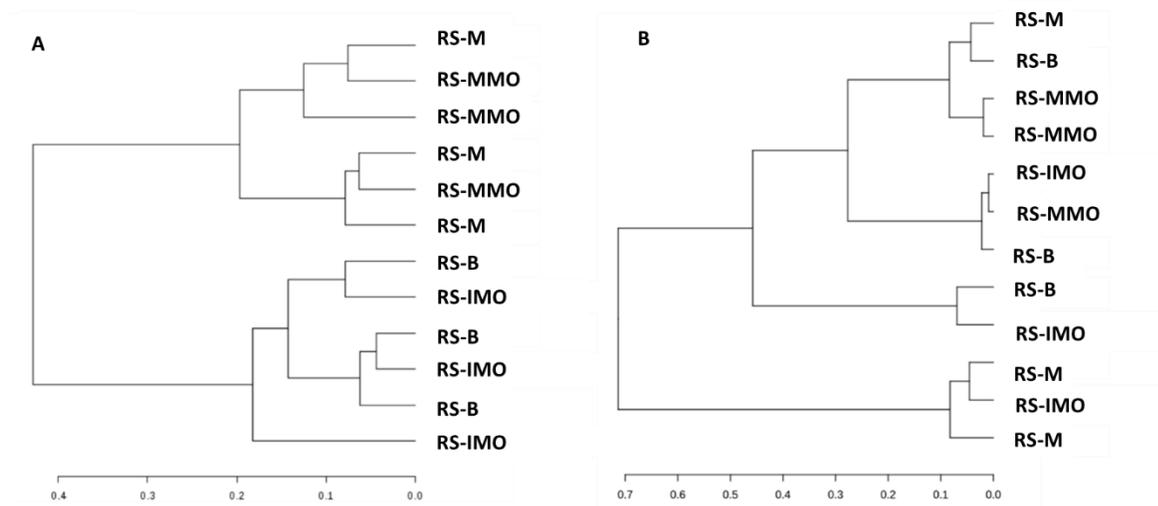
## Anexo E. Diversidad alfa en 16S rRNA e ITS en tiempo de floración

**Tabla:** Riqueza y diversidad de comunidades bacterianas y fúngicas. Para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con corrección de Bonferroni con un  $P < 0.05$ . Se presenta el promedio y la desviación estándar de  $n = 3$  son presentados para cada tratamiento.

Tratamientos	Comunidad Bacteriana			Comunidad Fúngica		
	ASVs/OTUs	Índice de Shannon	Índice de cobertura de Good's	ASVs/OTUs	Índice de Shannon	Índice de cobertura de Good's
<b>RS-M</b>	155 ± 13.6	4.19 ± 0.0	99.9 ± 0.0	69.3 ± 4.5	1.91 ± 0.2	99.9 ± 0.0
<b>RS-MMO</b>	149 ± 4.2	4.00 ± 0.2	99.9 ± 0.0	70.3 ± 3.5	1.85 ± 0.1	99.9 ± 0.0
<b>RS-IMO</b>	160 ± 16.0	4.11 ± 0.1	99.9 ± 0.0	68 ± 6.6	1.88 ± 0.1	99.9 ± 0.0
<b>RS-B</b>	159 ± 2.1	4.22 ± 0.0	99.9 ± 0.0	68.3 ± 3.1	1.82 ± 0.2	99.9 ± 0.0

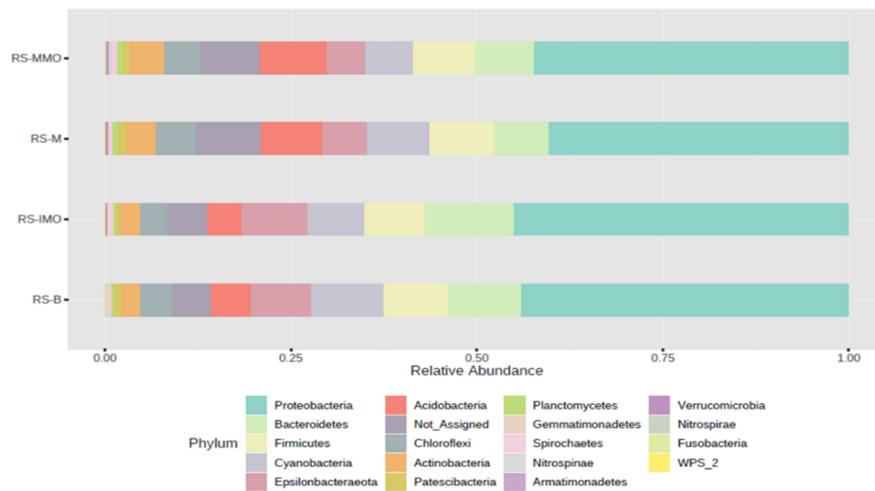
## **Anexo F. Agrupamiento jerárquico de comunidades bacteriana y fúngicas en tempo de floración**

**Figura:** Dendograma de agrupamiento jerárquico de tratamientos de manejo del arroz basados en la distribución de comunidades microbianas a nivel de filo. Se empleó la matriz de disimilitud de Bray-Curtis empleando el método de Ward. Dendograma de comunidad bacteriana (A) y comunidad fúngica (B).

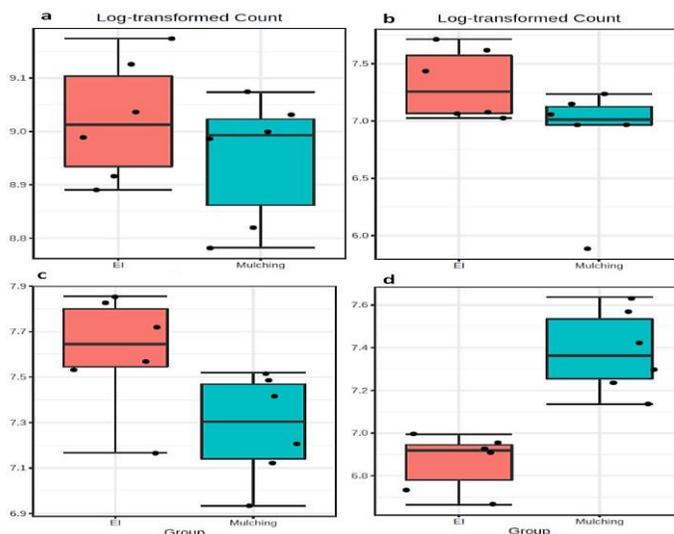


# Anexo G. Abundancia relativa de los filos bacterianos y filos que presentan diferencias estadísticas significativas

**Figura G1:** Abundancia relativa de filos bacterianos empleando secuencias de la comunidad microbiana obtenida al secuenciar el 16S rRNA. El gráfico de barras muestra el promedio de la abundancia de tres réplicas por tratamiento.

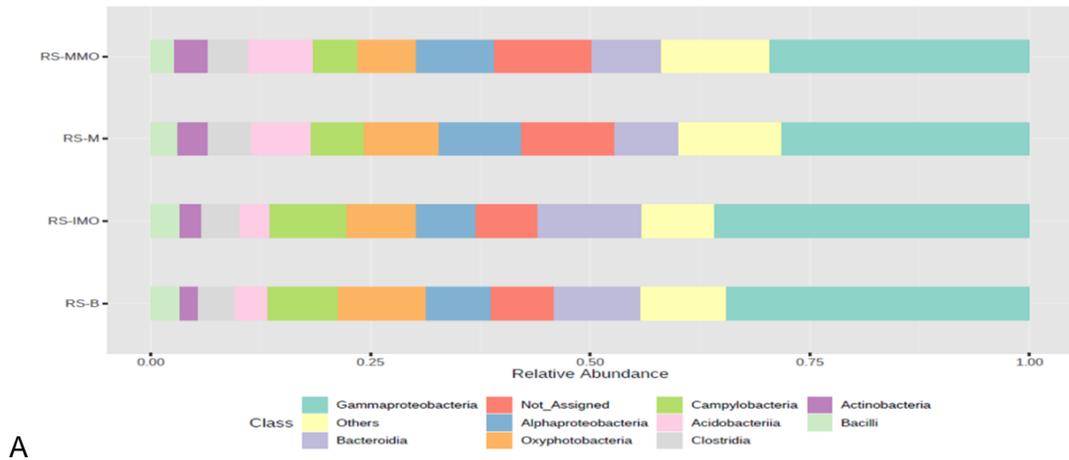


**Figura G2:** Logaritmo transformado de conteos que significativamente difirieron entre los tratamientos incorporados tempranamente (EI) y los tratamientos de cobertura (M) a nivel de filo *Proteobacteria* ( $P = 0.024$ ), *Epsilonbacteraeota* ( $P = 0.024$ ), *Bacteroidetes* ( $P = 7.036E4$ ), and *Acidobacteria* ( $P = 0.007$ )

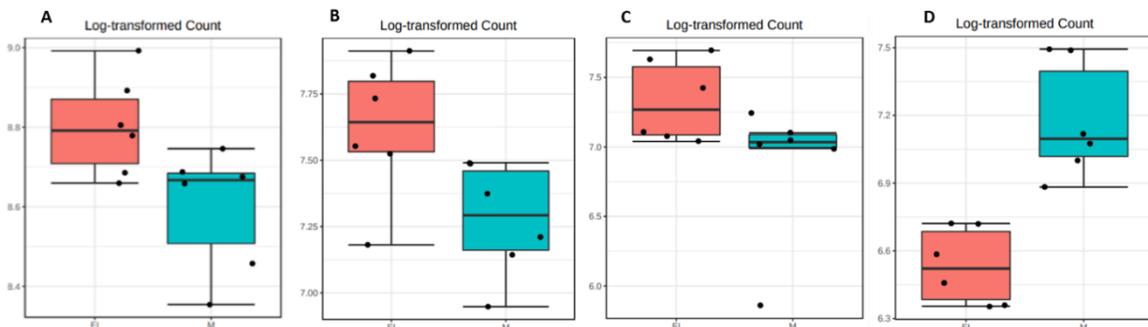


## Anexo H. Abundancia relativa de clases bacterianas más representativas y clases que presentaron diferencias estadísticas significativas

**Figura H1:** Abundancia relativa de las 9 clases bacterianas más abundantes. El gráfico de barras muestra el promedio de abundancia de tres tratamientos por muestra.

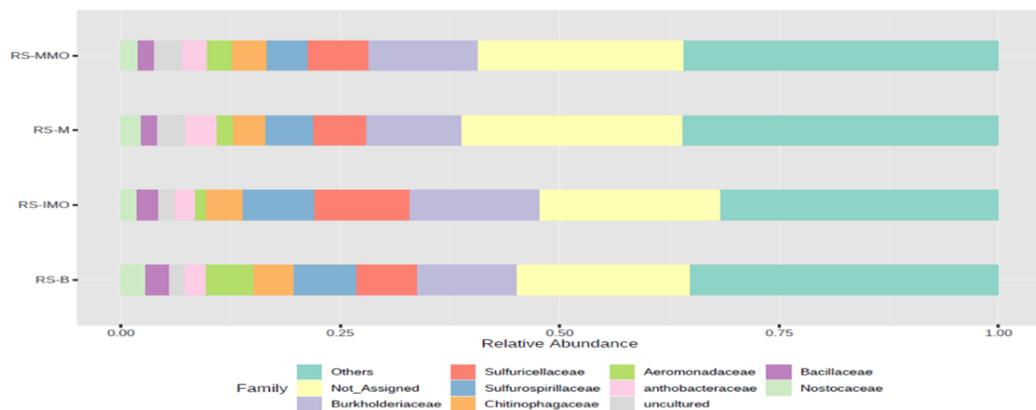


**Figura H2:** Logaritmo transformado de conteos con diferencia estadísticas significativas a  $P \leq 0.05$ , de tratamientos incorporados tempranamente (*EI*) en comparación con los tratamietnos de cobertura (*M*) a nivel de clase, *Gammaproteobacteria* ( $P = 0.0024$ ) (A); *Bacteroidia* ( $P = 0.0032$ ) (B); *Campylobacteria* ( $P = 0.033$ ) (C); y *Acidobacteriia* ( $P = 0.0024$ ) (D).

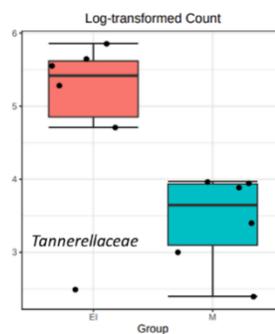


# Anexo I. Abundancia relativa de familias bacterianas y familias que presentan diferencias estadísticas significativas

**Figura I1:** Abundancia relativa de las ocho familias bacterianas. El gráfico de barras presenta el promedio de abundancia de tres réplicas por tratamiento.

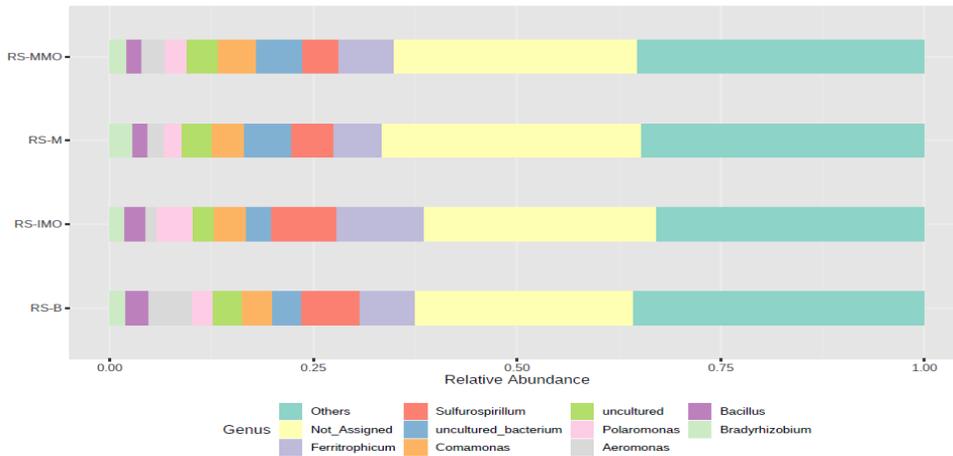


**Figura I2:** Logaritmo transformado de conteos que significativamente difirieron entre los grupos de tratamiento incorporados tempranamente (EI) y los tratamientos de cobertura (M) a nivel de familia  $P < 6346E-4$ .

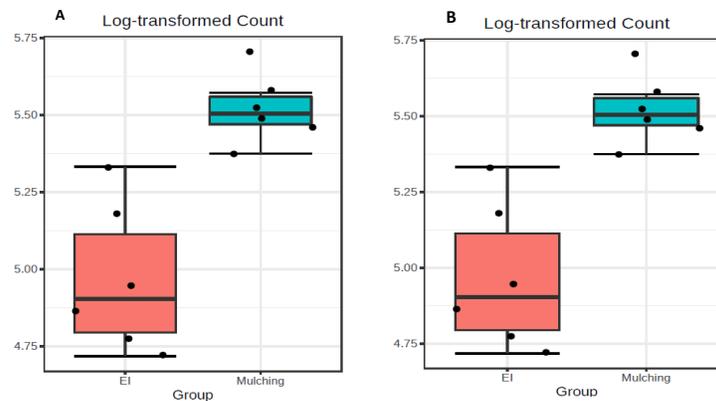


## Anexo J. Abundancia relativa de hongos a nivel de género y géneros que presentaron diferencias estadísticas significativas

**Figura J1:** Abundancia relativa de los 7 géneros más abundantes, El gráfico de barras representa el promedio de abundancia de 3 réplicas

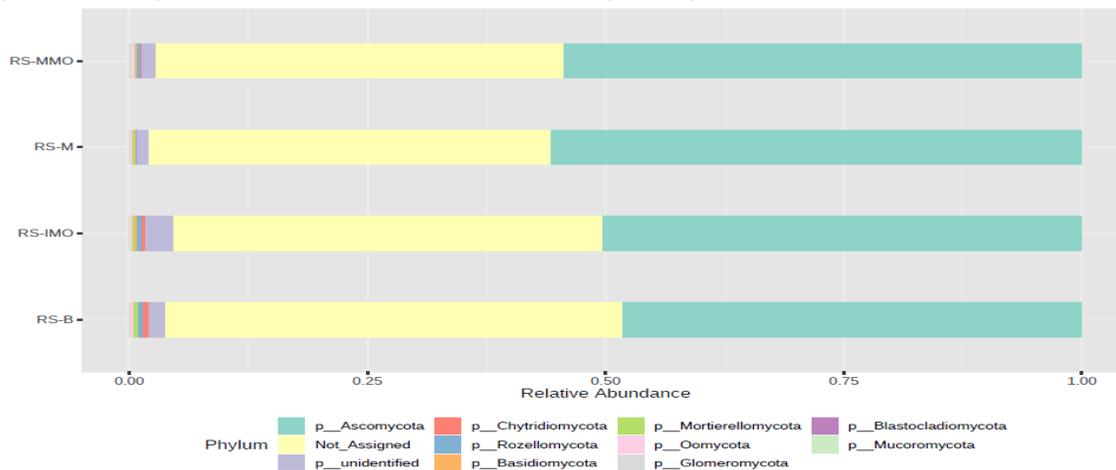


**Figura J2:** Logaritmo transformado de conteos que significativamente difirieron entre los grupos de tratamiento incorporados tempranamente (EI) y los tratamientos de cobertura (M) a nivel de género  $P < 0.05$ . . A. *Bryobacter* ( $P = 0.046$ ) and B. *Micromonospora* ( $P = 0.046$ ).

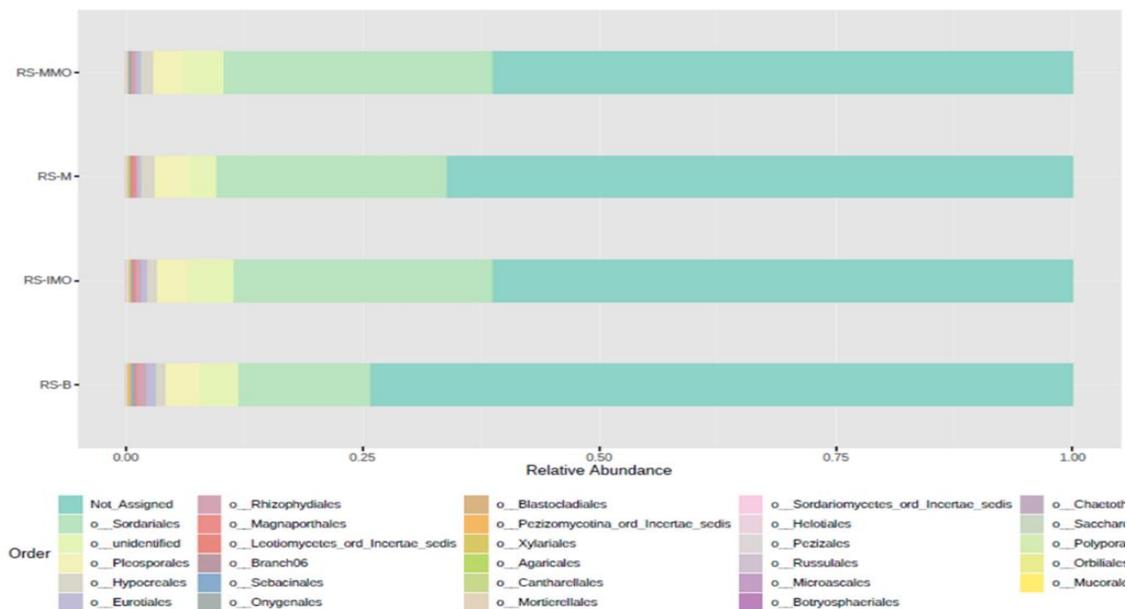


## Anexo K. Abundancia relativa de filos y ordenes fúngicos más representativos

**Figura K1:** Abundancia relativa de los nueve filos fúngicos presentes. El gráfico de barras presenta el promedio de abundancia de tres réplicas por tratamiento.

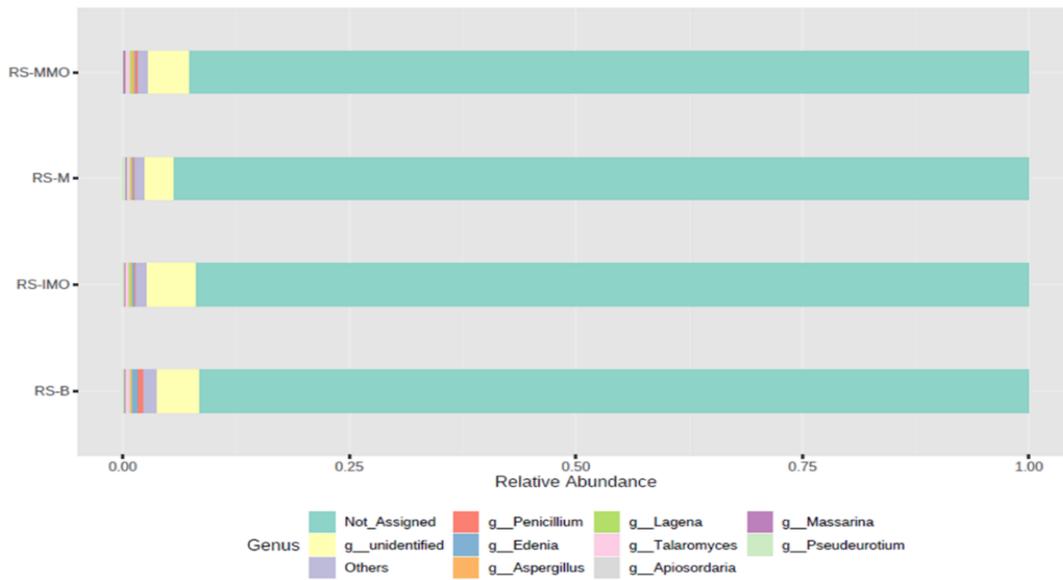


**Figura K2:** Abundancia relativa de los órdenes fúngicos presentes. El gráfico de barras presenta el promedio de abundancia de tres réplicas por tratamiento.

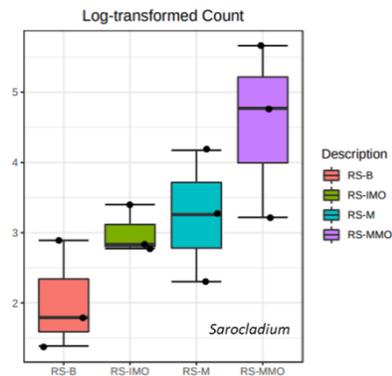


## Anexo L. Abundancia relativa a nivel de género y diferencias estadísticas significativas a nivel de género

**Figura L1:** Abundancia relativa de ocho géneros de hongos más abundantes. El gráfico de barras muestra el promedio de abundancia de tres por tratamiento.

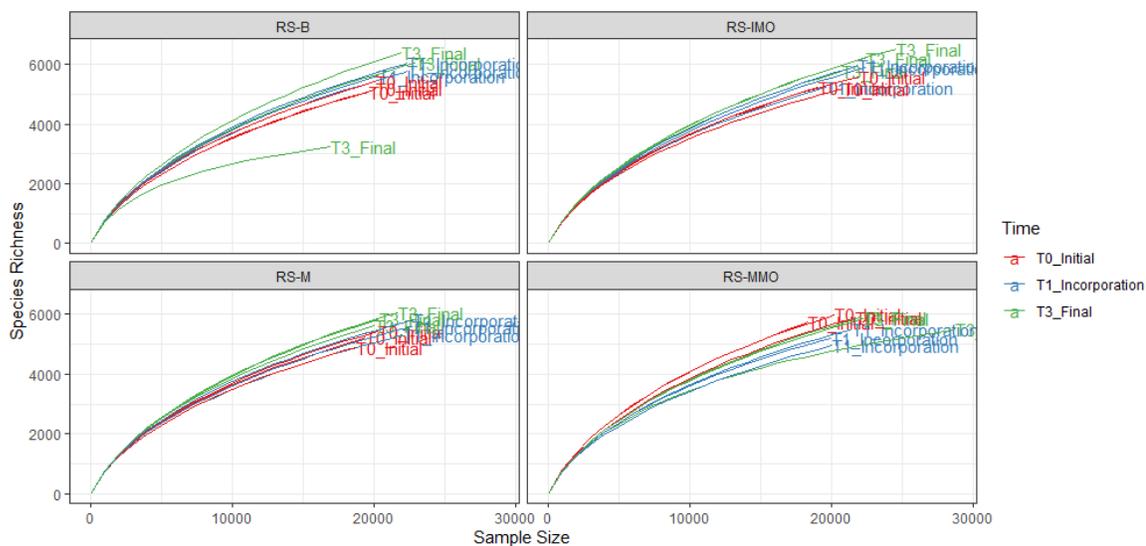


**Figura L2:** Logaritmo transformado de conteos del microorganismo que presentó diferencias estadísticas significativas a nivel de género entre todos los tratamientos  $P = 0.0018$  (\*\*\*)).

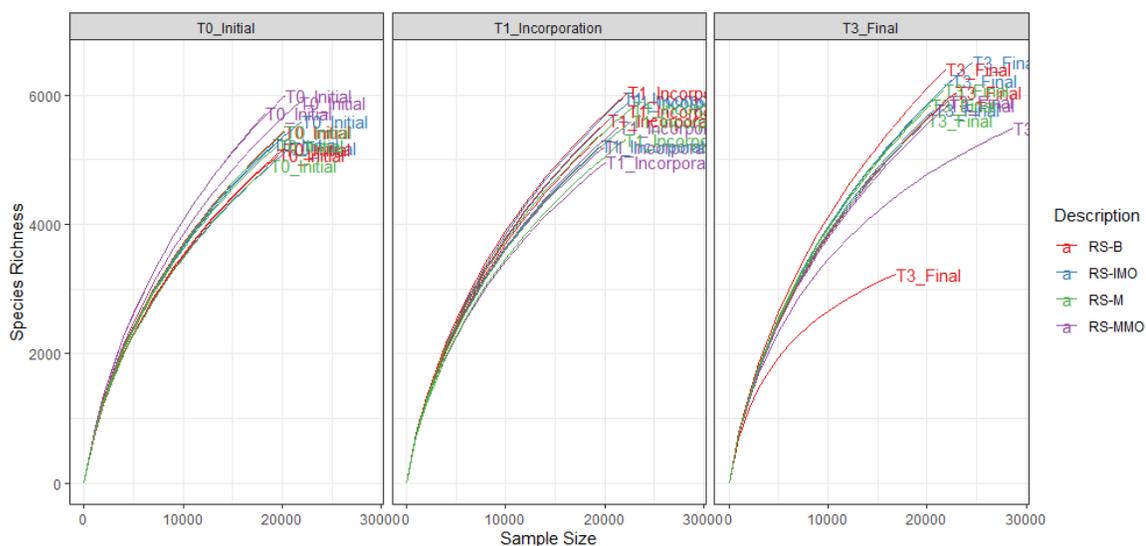


## Anexo M. Rarefacción 16S rRNA de tiempos inicial, degradación y final

**Figura M1:** Curvas de rarefacción de los tratamientos RS-MMO, RS-IMO, RS-B y RS-M de todos los tiempos n =9.

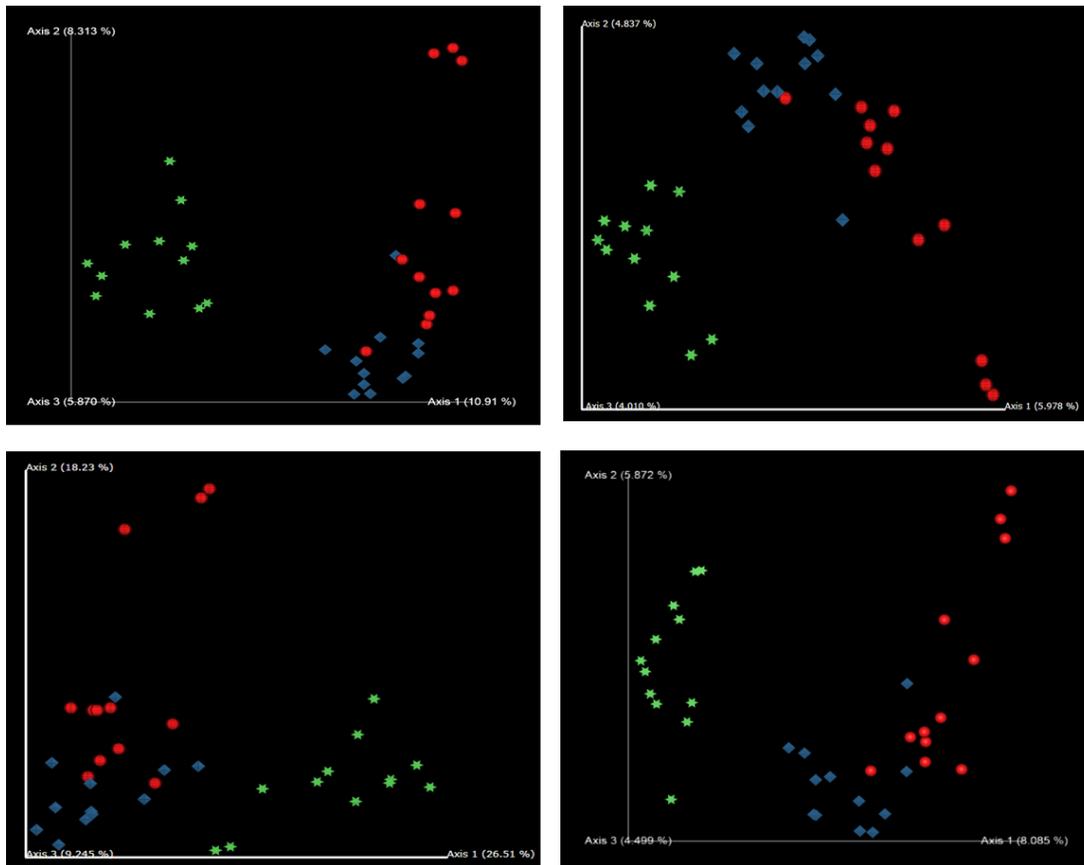


**Figura M2:** Curvas de rarefacción de los tratamientos RS-MMO, RS-IMO, RS-B y RS-M de todos los tiempos n =9.



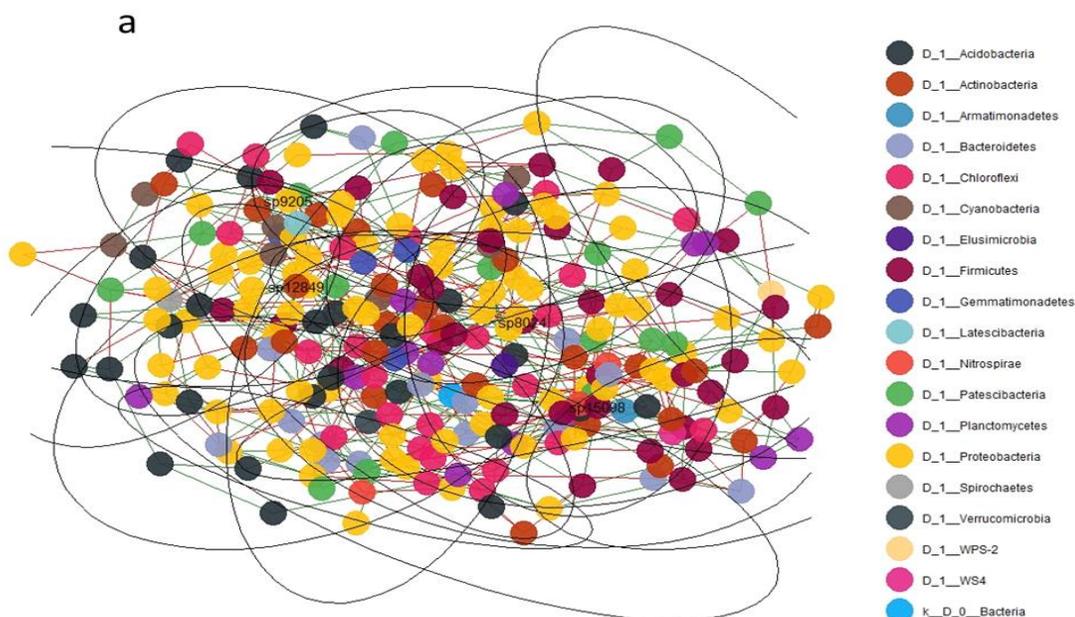
## Anexo N. Análisis de Beta-diversidad de los tiempos, inicial, degradación y final

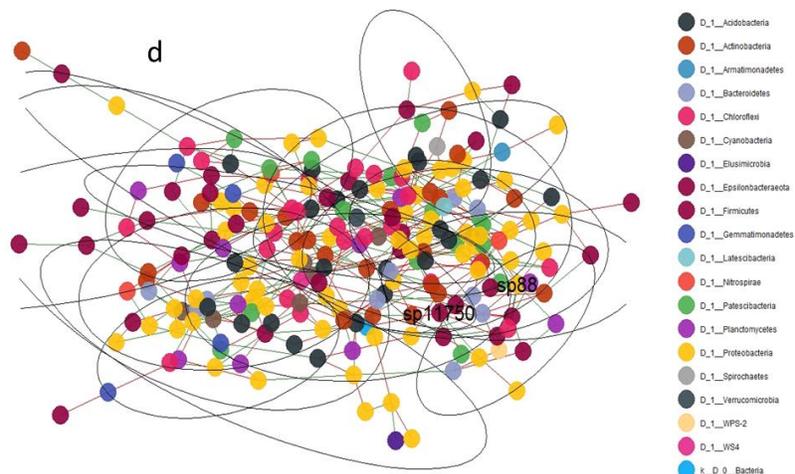
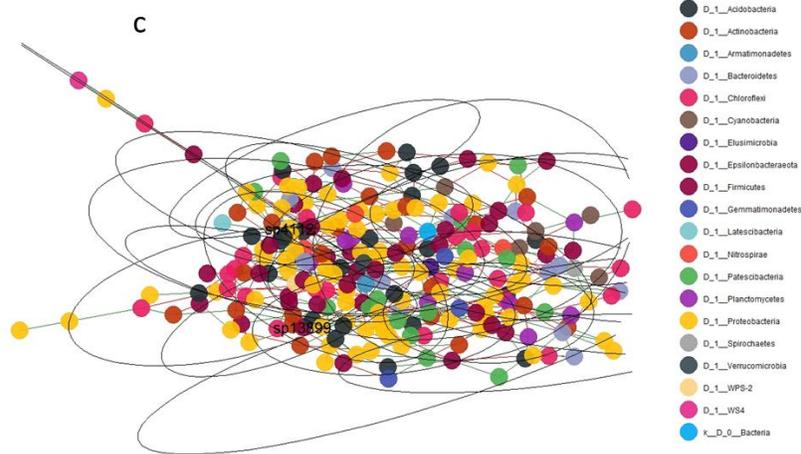
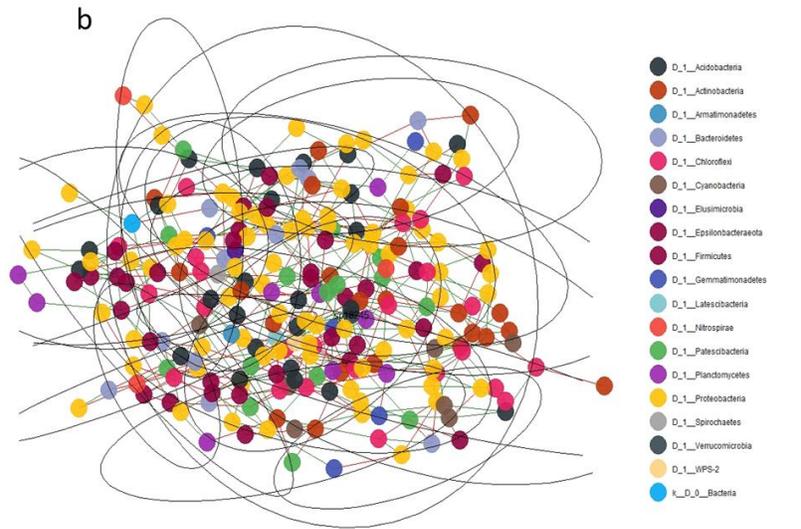
**Figura:** Beta-diversidad de los tiempos inicial, degradación y final. A. Bray-Curtis, B. Jacard, C. Weighthed y D. Unweight Unifrac



## Anexo O. Análisis de redes de co-ocurrencia de cada uno de los tratamientos a través del tiempo.

**Figura:** Análisis de las redes de co-ocurrencia de cada uno de los tratamientos a través del tiempo. En estas redes se señalan líneas de color verde las correlaciones positivas y las líneas en rojo denotan las correlaciones negativas. Las elipses señalan los diferentes módulos que componen la red y los números en paréntesis al frente de cada tratamiento señalan los *key taxa* de cada red. (a) RS-MMO (sp8024-*Paenibacillus*, sp9205-*Synthrophaceae*, sp12849-*Actinobacteria* y sp15098-*Clostridium*). (b) RS-IMO (sp18245-*Pedosphaeraceae*). (c) RS-B (sp4112-*Pandoraea* y sp11750-*Bacillus*). (d) RS-M (sp88-*Sphingomonadaceae* y sp11750-*Sulfuricurvum*).





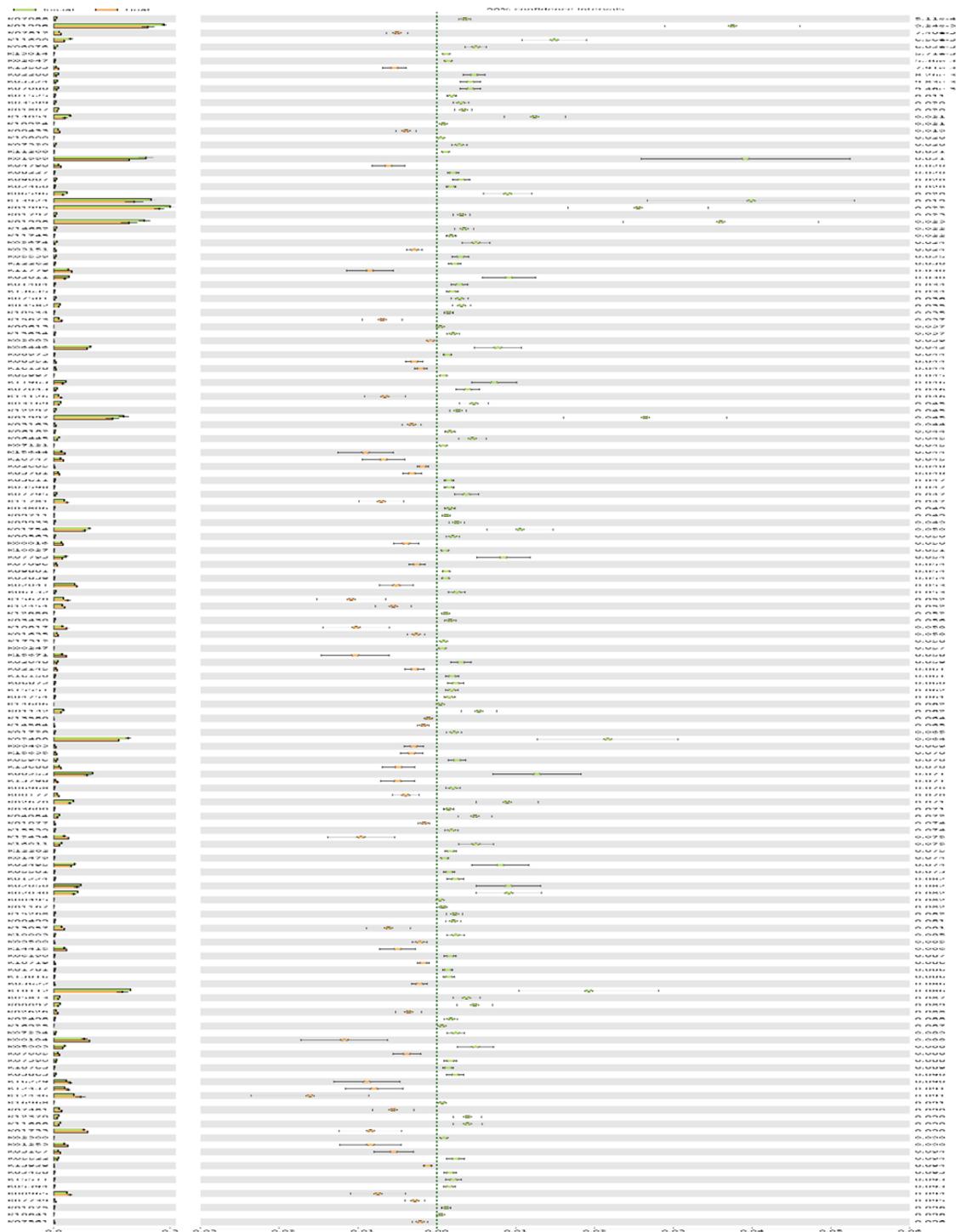
## Anexo P. Número de secuencias antes y después de la limpieza en los tiempos, inicial, degradación y final

		Seq initial	After host remove	Eliminadas			After remove host	Sickle_Q30_L75	Eliminadas_Q30_L75
T0	T1P1	28.803.846	28.798.112	<b>5.734</b>		T1P1	28.798.112	19.497.368	9.300.744
	T1P2	33.242.979	33.222.528	<b>20.451</b>		T1P2	33.222.528	22.911.596	10.310.932
	T1P3	26.386.884	26.293.967	<b>92.917</b>		T1P3	26.293.967	19.157.964	7.136.003
	T2P1	30.099.633	30.088.194	<b>11.439</b>		T2P1	30.088.194	21.523.342	8.564.852
	T2P2	40.766.777	40.759.255	<b>7.522</b>		T2P2	40.759.255	27.107.718	13.651.537
	T2P4	36.879.055	36.875.107	<b>3.948</b>		T2P4	36.875.107	27.681.452	9.193.655
	T3P1	37.679.641	37.669.417	<b>10.224</b>		T3P1	37.669.417	26.626.061	11.043.356
	T3P3	36.240.352	36.227.028	<b>13.324</b>		T3P3	36.227.028	26.009.636	10.217.392
	T3P4	23.055.269	23.047.785	<b>7.484</b>		T3P4	23.047.785	15.721.232	7.326.553
	T4P1	30.552.328	30.525.502	<b>26.826</b>		T4P1	30.525.502	20.326.516	10.198.986
	T4P2	30.172.048	30.161.404	<b>10.644</b>		T4P2	30.161.404	21.132.032	9.029.372
	T4P4	32.352.050	32.324.586	<b>27.464</b>		T4P4	32.324.586	21.596.059	10.728.527
T1	T1P1	31.850.561	31.817.214	<b>33.347</b>		T1P1	31.817.214	22.585.190	9.232.024
	T1P2	26.985.884	26.966.710	<b>19.174</b>		T1P2	26.966.710	19.686.508	7.280.202
	T1P3	35.701.850	35.683.781	<b>18.069</b>		T1P3	35.683.781	25.523.572	10.160.209
	T2P1	37.715.568	37.708.801	<b>6.767</b>		T2P1	37.708.801	27.589.559	10.119.242
	T2P2	22.186.094	22.171.791	<b>14.303</b>		T2P2	22.171.791	14.717.157	7.454.634
	T2P4	34.429.148	34.421.695	<b>7.453</b>		T2P4	34.421.695	25.047.535	9.374.160
	T3P1	31.978.402	31.974.609	<b>3.793</b>		T3P1	31.974.609	22.474.323	9.500.286
	T3P3	21.472.602	21.469.998	<b>2.604</b>		T3P3	21.469.998	11.781.463	9.688.535
	T3P4	29.952.836	29.950.308	<b>2.528</b>		T3P4	29.950.308	19.672.007	10.278.301
	T4P1	36.261.756	36.248.191	<b>13.565</b>		T4P1	36.248.191	26.602.820	9.645.371
	T4P2	27.019.939	27.008.087	<b>11.852</b>		T4P2	27.008.087	13.951.525	13.056.562
	T4P4	37.847.501	37.825.034	<b>22.467</b>		T4P4	37.825.034	27.081.709	10.743.325
T3	T1P1	22.752.684	22.694.415	<b>58.269</b>		T1P1	22.694.415	13.650.229	9.044.186
	T1P2	37.546.211	37.490.290	<b>55.921</b>		T1P2	37.490.290	25.155.584	12.334.706
	T1P3	24.349.581	24.319.980	<b>29.601</b>		T1P3	24.319.980	15.484.297	8.835.683
	T2P1	25.967.356	25.908.461	<b>58.895</b>		T2P1	25.908.461	16.669.584	9.238.877
	T2P2	28.253.942	28.225.006	<b>28.936</b>		T2P2	28.225.006	17.920.090	10.304.916
	T2P4	30.080.883	30.045.775	<b>35.108</b>		T2P4	30.045.775	19.326.729	10.719.046
	T3P1	35.789.178	35.700.447	<b>88.731</b>		T3P1	35.700.447	24.049.935	11.650.512
	T3P3	27.371.189	27.360.434	<b>10.755</b>		T3P3	27.360.434	16.387.234	10.973.200
	T3P4	33.108.342	33.093.189	<b>15.153</b>		T3P4	33.093.189	25.587.169	7.506.020
	T4P1	31.001.779	30.956.163	<b>45.616</b>		T4P1	30.956.163	21.588.842	9.367.321
	T4P2	28.238.135	28.184.458	<b>53.677</b>		T4P2	28.184.458	18.862.145	9.322.313
	T4P4	33.036.635	33.012.141	<b>24.494</b>		T4P4	33.012.141	22.793.288	10.218.853
	<b>Promedio</b>	<b>31.031.359</b>	<b>31.006.385</b>	<b>24.974</b>		<b>Promedio</b>	<b>31.006.385</b>	<b>21.207.763</b>	<b>9.798.622</b>

# Anexo Q. Resultados de BGCs mediante AntiSMASH para bacterias y hongos, en los tiempos inicial degradación y final

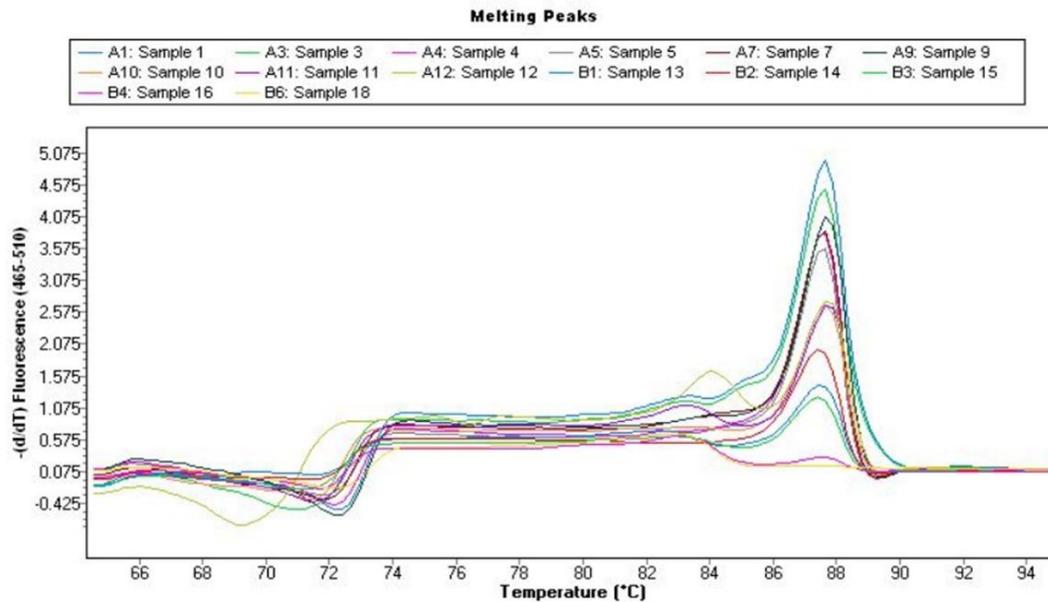
	Anti-SMASH: Bacteria	Similarity (%)	Anti-SMASH: Bacteria without similarity	anti-SMASH Fungi	Similarity (%)	Anti-SMASH: Fungi without similarity		
T0	T1P1	Hopene (terpene) icosalide A/icosalide B (lipopeptide)	15 100	Terpene, NRPS, arylpolyene	icosalide A/ icosalide B(NRP:lipopeptide)	100	NRPS, arylpolyene	
	T1P2						terpene, hserlactone, proteusin, NRPS	
	T1P3	NRPS-like T1PKS	100 100	Terpene, NRPS, indole, Proteusin, bacteriocin, acyl amino adds	enduracidin (NRP) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) 1-nonadecene / (14Z)-1,14-nonadecadiene (Polyketide: modular type I)	6 100 100	terpene, NRPS-like, indole, hgIE-KS, terpene, NRPS, hserlactone	
	T2P2	NI		NI	RP-1776 (polyketide + NRP: cyclic depsipeptide) icosalide A/ icosalide B(NRP:lipopeptide)	6 100	NRPS-like, resorcinol, arylpolyene, hserlactone, terpene, NRPS, hgIE-KS,	
	T3P1	NI		NI	anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP) icosalide A/ icosalide B(NRP:lipopeptide)	100 100	indole, terpene, T1PKS, NRPS-like, hgIE-KS, bacteriocin, T1PKS, NRPS,	
	T3P4	NI		NI	anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP)	100	LAP, terpene, arylpolyene, resorcinol, hserlactone, NRPS,	
	T4P1	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Hopene (terpene)	100 15	NRPS, terpene			terpene, NRPS, hserlactone, resorcinol, hgIE-KS, arylpolyene, bacteriocin,	
	T4P2	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Hopene (terpene)	100 15	terpene, NRPS, bacteriocin, hgIE-KS, Proteusin	anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP)	100	NRPS, terpene,	
	T4P4	NI		NI			NRPS, terpene, hgIE-KS, proteusin, bacteriocin	
	T1	T1P1	NI	NI	icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide)	100	bacteriocin, hgIEKS, terpene, indole, T1PKS, NRPS-like, NRPS,	
		T1P2	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Hopene (terpene) Bicopropin K139 (NRP + Polyketide) Pyoverdinin (NRP) APE-VI (Arylpolyene)	100 25 50 3	arylpolyene, terpene, T1PKS, bacteriocin, arylpolyene, hserlactone, NRPS, anthipeptide, proteusin, LAP,	icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide)	100	terpene, bacteriocin, hserlactone, proteusin,
		T1P3	NI	NI	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100	terpene, NRPS, bacteriocin, hgIE-KS, T1PKS, indole, proteusin, NRPS-like, arylpolyene	
		T2P1	NI	NI	icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide) 1-heptadecene (polyketide: modular type I) 1-heptadecene (polyketide: modular type I) icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide) oxalomycin B (NRP + polyketide)	100 100 100 100 9	terpene, NRPS-like, TPKS, NRPS, hgIE-KS, indole, bacteriocin	
		T2P2	Oxalomycin B (NRP + Polyketide) Bicornutin A1/ bicornutin A2 (NRP) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Chuangimycin (alkaloid / bacteriocin) avermiltol (Terpene) NRP (NRPS)	9 100 100 20 100 62	T1PKS, T3PKS, furan, NRPS-like, butyrolactone, resorcinol, PKS-like, siderophore, NRPS, hgIE-KS, acyl-amino-acids, hserlactone, terpene,	geosimina (terpene) bicornutin A1 / bicornutin A2 (NRP) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Chuangimycin (alkaloid /bacteriocin) avermiltol (terpene) FR900359 (NRP)	100 100 100 20 100 62	terpene, hgIE-KS, bacteriocin, T1PKS, hgIE-KS, terpene, NRPS
T3P1		NI	NI	NI	icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide)	100	terpene, hgIE-KS, bacteriocin, T1PKS, hgIE-KS, terpene, NRPS	
T3P3		Hopene (terpene)	15	terpene, resorcinol, hserlactone				
T3P4		1-nonadecene / (14Z)-1,14-nonadecadiene (Polyketide: modular type I) icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100 100 100	terpene, indole, T3PKS, resorcinol, bacteriocin			terpene, indole, bacteriocin	
T4P1		NI	NI	NI	anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP) icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide)	100 100	bacteriocin, proteusin, terpene, T1PKS, NRPS, NRPS-like, hgIE-KS	
T4P2		anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100 100	terpene, NRPS, indole, proteusin			T1PKS, indole, terpene, bacteriocin, NRPS-like, hgIE-KS	
T4P4		NI	NI	NI				
T3		T1P1	Terpene	15	Terpene			Terpene
		T1P2	NI	NI	NI	icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide) icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide)	100 100	T3PKS, NRPS, bacteriocin, indole, T1PKS, NRPS-like, terpene
		T1P3	Carotenoid (Terpene)	18	NRPS, terpene, bacteriocin, T1PKS	icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide)	100	bacteriocin
	T2P1	merochlorin A/ merochlorin B/deschloro-merochlorin A/deschloro-merochlorin B / deschloro-merochlorin C/ deschloro-merochlorin D/ merochlorin (Polyketide type III) icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide) icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide)	4 100 100	terpene, NRPS	icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide)	100	T3PKS, NRPS	
	T2P2	hopene (terpene)	15	terpene, NRPS, T1PKS, bacteriocin,			terpene, NRPS	
	T2P4	icosalide A/ icosalide B (NRP: lipopeptide) Hopene (terpene)	100 15	Bacteriocin, NRPS, terpene, indole, T1PKS, proteusin, bacteriocin, hgIE-KS	icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide) icosalide A/ icosalide N (NRP: lipopeptide)	100 100	terpene, indole	
	T3P1	NI	NI	NI	1-heptadecene (polyketide: modular type I)	100	NRPS-like, terpene, proteusin,	
	T3P3	anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP) bicornutin A1 / bicornutin A2 (NRP) bicornutin A1 / bicornutin A2 (NRP)	100 100 100	NRPS, terpene, T1PKS			terpene	
	T3P4	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) Hopene (terpene) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS) NRPS (NRP) isorenieratene (terpene) rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100 15 100 6 28 100	terpene, NRPS, bacteriocin, proteusin,	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100	terpene, bacteriocin, NRPS-like	
	T4P1	isorenieratene (terpene) Hopene (terpene)	25 23	NRPS, NRPS-like, terpene, transAT-PKS-like	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C (NRPS)	100	NRPS, bacteriocin	
	T4P2	isorenieratene (terpene) Hopene (terpene) bicornutin A1 / bicornutin A2 (NRP)	25 100 100	NRPS, NRPS-like, terpene, transAT-PKS-like			NRPS, terpene	
	T4P4	merochlorin A/ merochlorin B/deschloro-merochlorin A/deschloro-merochlorin B / deschloro-merochlorin C/ deschloro-merochlorin D/ merochlorin (polyketide type III) anabaenopeptin NZ857 / nostamide A (NRP)	7 100	terpene, bacteriocin, indole, NRPS, hgIE-KS, arylpolyene, proteusin, T1PKS,			terpen, indole, hgIE-KS, bacteriocin, T3PKS	
	<b>NI</b> Not information Information without % similarity							

# Anexo R. Diferencias en el potencial funcional entre tiempo inicial y tiempo final

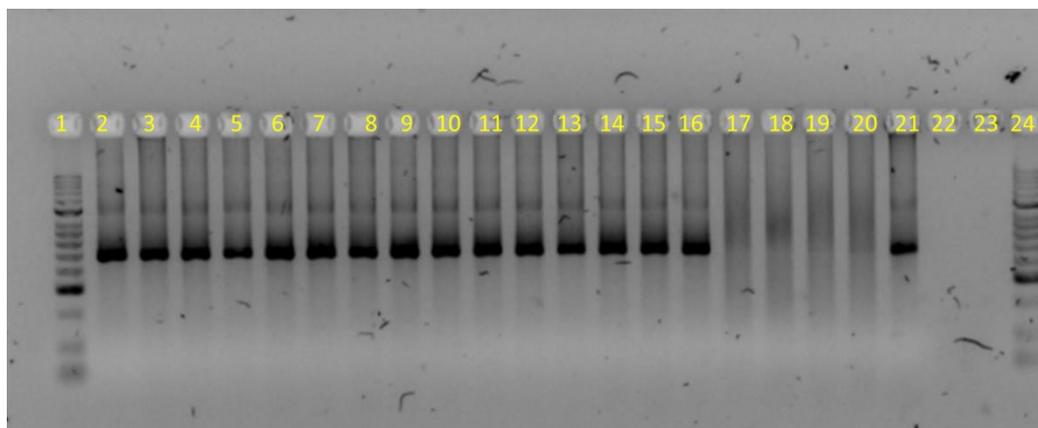


## Anexo S. Tm de gen *amoA* de bacterias

**Figura S1:** Análisis del Tm para el gen *amoA*.

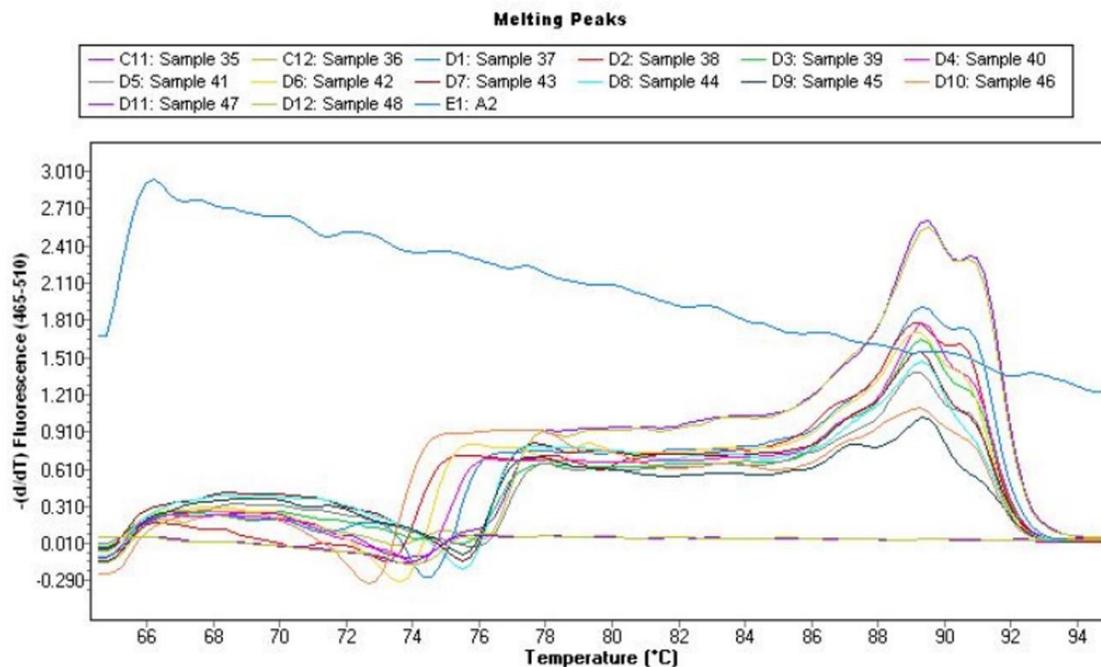


**Figura S2:** Electroforesis en gel de agarosa del gen *amoA* de bacterias por qPCR. 1. MP hyperladder II. 2-20 diluciones de suelo. 21 Muestra de suelo 22-23 control de reactivos. 24 MP hyperladder II.

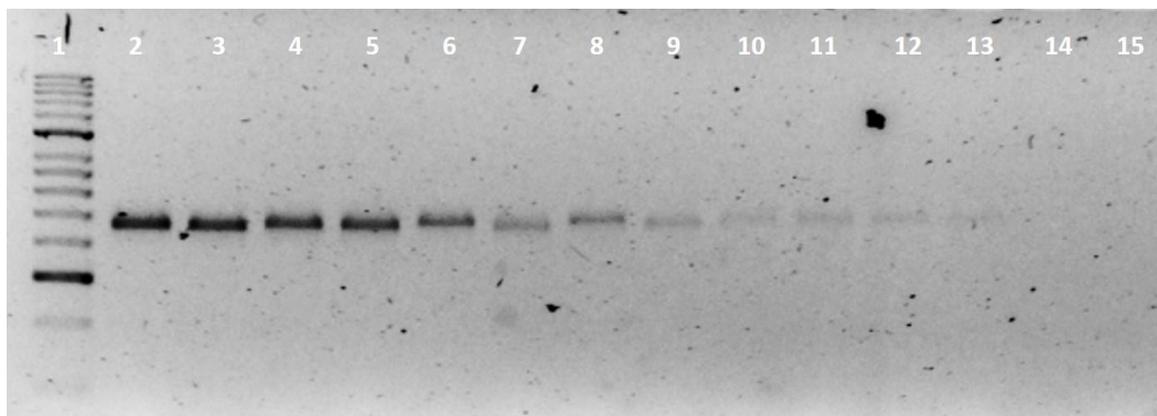


## Anexo T. Tm de gen *nifH* de bacterias

**Figura T1:** Análisis del Tm para el gen *nifH*.

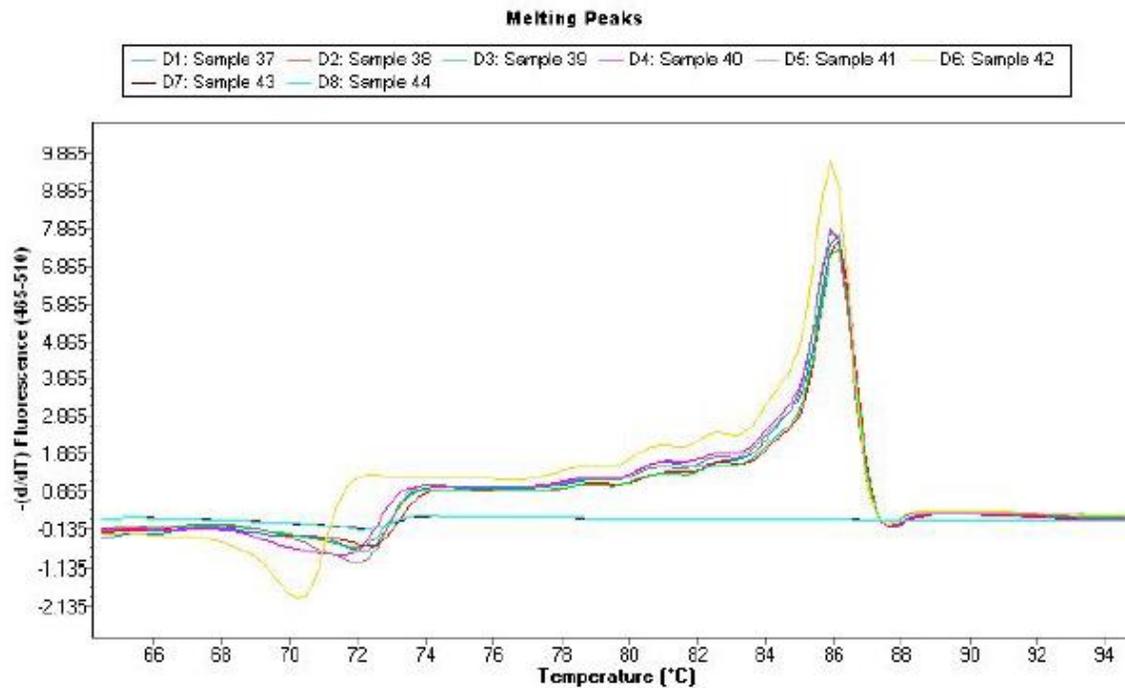


**Figura T2:** Electroforesis en gel de agarosa del gen *nifH* por qPCR. 1. MP hyperladder II. 2-13 diluciones de suelo. 14-15 control de reactivos.

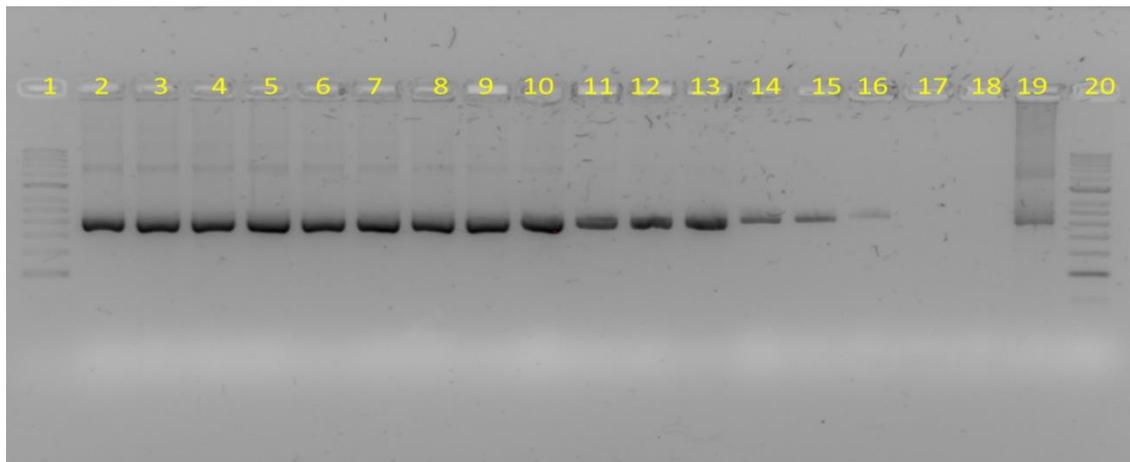


## Anexo U. Tm de gen *amoA* de arqueas

**Figura U1:** Análisis de TM calling para el gen *amoA.A*

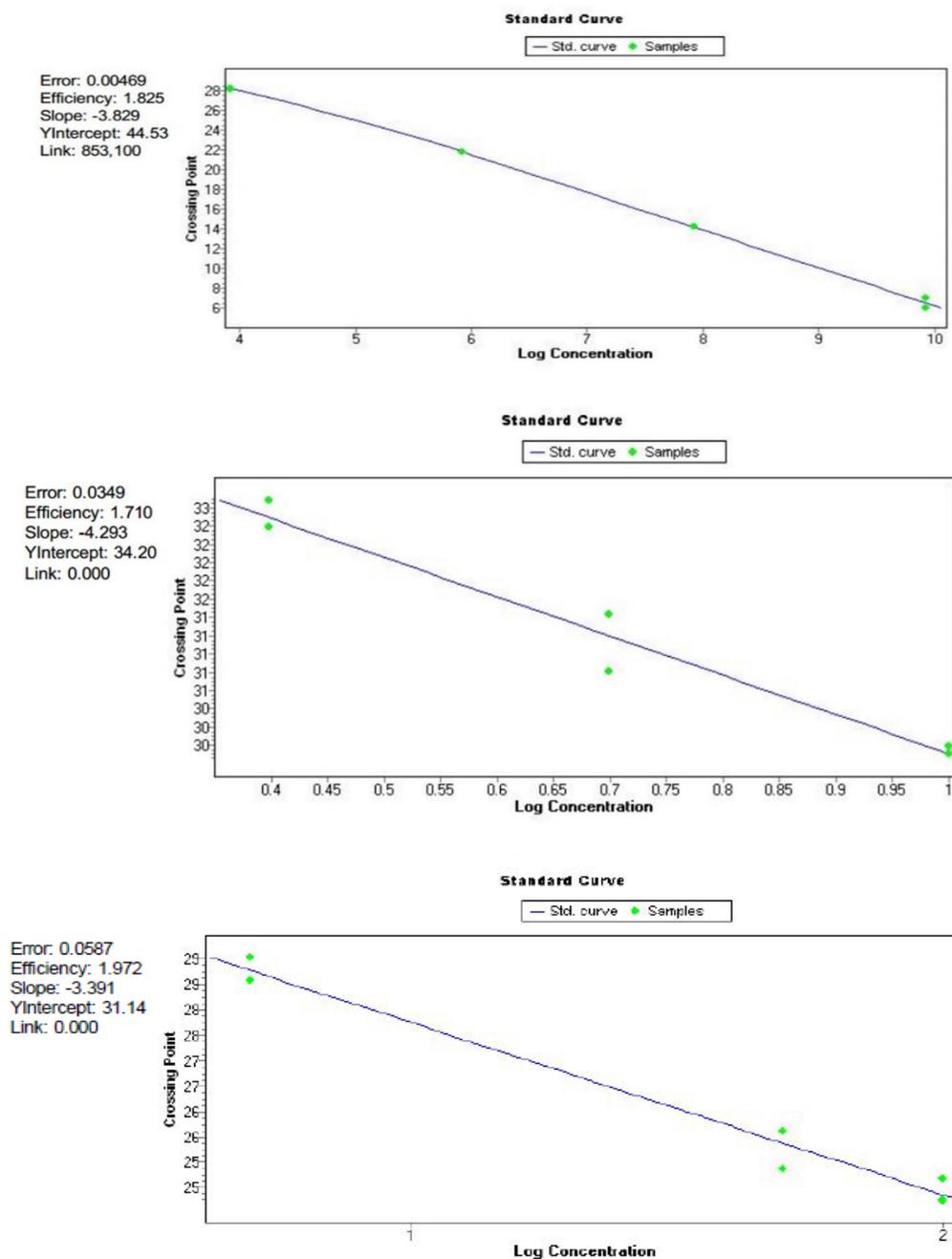


**Figura U2:** Electroforesis en gel de agarosa del gen *amoA* de arqueas por qPCR. 1. MP hyperladder II. 2-16 diluciones de suelo. 17-18 control de reactivos. 19 muestra de suelo. 20. MP hyperladder II



## Anexo V. Curva estándar para los genes *amoA* de bacterias

**Figura V1:** Curva de calibración estándar de qPCR para el gen *amoA* de bacterias (a), *nifH* de bacterias (b) y *amoA* de arqueas (c)





## Bibliografía

- Abarca, C., Martínez, A., Caro, M., & Quintero, R. (1992). Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai. *Universidad: Ciencia y Tecnología*, 2(3), 51–56. <http://www.ibt.unam.mx/alfredo/OptimizacionBthuringiensis.pdf>
- Abarenkov, K., Henrik Nilsson, R., Larsson, K., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186(2), 281–285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x>
- Abin, C. A., & Hollibaugh, J. T. (2016). Draft genome sequence for the type strain *Vulcanibacillus modesticaldus* BR, a strictly anaerobic, moderately thermophilic, and nitrate-reducing bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *Genome Announcements*, 4(6), 6–7. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01246-16>
- Abril, D., Navarro, E. A., & Abril, A. J. (2009). La paja de arroz, consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 17(January), 69–79.
- Acosta-Martínez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D., & Pérez-Alegría, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*, 35(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.05.012>
- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599.

- <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Agronet. (2019, August 2). *Estadísticas home*.  
<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Ahmed, A. I., Omer, A. M., Ibrahim, A. I., & Agha, M. K. (2018). *Brevibacillus Spp.* in Agroecology: The Beneficial Impacts in Biocontrol of Plant Pathogens and Soil Bioremediation. *Fungal Genomics & Biology*, 08(02). <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000157>
- Alam, S. . (1981). S . M . *Alam Atomic Energy Agricultural Research Centre , Tandojam , Rice plants were grown in solution culture for a period of five weeks at pH ' s ranging from 3 . 5 to 8 . 5 . Maximum dry matter was obtained at pH 5 . 5 , but substantial reductions in. 4, 247–260.*
- Alberto, M. C. R., Wassmann, R., Gummert, M., Buresh, R. J., Quilty, J. R., Correa, T. Q., Centeno, C. A. R., & Oca, G. M. (2015). Straw incorporated after mechanized harvesting of irrigated rice affects net emissions of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> based on eddy covariance measurements. *Field Crops Research*, 184, 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.10.004>
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). Enzyme activities. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (pp. 311–373). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50022-7>
- Allison, S. D., & Martiny, J. B. H. (2009). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *In the Light of Evolution*, 2, 149–166. <https://doi.org/10.17226/12501>
- Alvira, P., Negro, M., & Ballesteros, M. (2011). *Effect of endoxylanase and α-L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw.*
- Ambavaram, M. M. R., Krishnan, A., Trijatmiko, K. R., & Pereira, A. (2011). Coordinated activation of cellulose and repression of lignin biosynthesis pathways in rice. *Plant Physiology*, 155(2), 916–931. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168641>
- Anasontzis, G. E., Thuy, N. T., Hang, D. T. M., Huong, H. T., Thanh, D. T., Hien, D. D., Thanh, V. N., & Olsson, L. (2017). Rice straw hydrolysis using secretomes from novel fungal isolates from Vietnam. *Biomass and Bioenergy*, 99, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.02.008>
- Aulakh, M. S., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., & Rennenberg, H. (2001). Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa*)

- L.) cultivars. *Plant Biology*, 3(2), 139–148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12905>
- Bacilio-jiménez, M., Aguilar-flores, S., Ventura-zapata, E., Pérez, E., Bouquelet, S., & Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249(2), 271–277.
- Bailey, K. L., & Lazarovits, G. (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research*, 72(2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00086-2)
- Banerjee, S., Kirkby, C. A., Schmutter, D., Bissett, A., Kirkegaard, J. A., & Richardson, A. E. (2016). Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.017>
- Banning, N. C., Maccarone, L. D., Fisk, L. M., & Murphy, D. V. (2015). Ammonia-oxidising bacteria not archaea dominate nitrification activity in semi-arid agricultural soil. *Scientific Reports*, 5(March), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep11146>
- Bao, Y., Feng, Y., Stegen, J. C., Wu, M., Chen, R., Liu, W., Zhang, J., Li, Z., & Lin, X. (2020). Straw chemistry links the assembly of bacterial communities to decomposition in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 148(September 2019), 107866. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107866>
- Barrera, S. E., Sarango-Flóres, S.-W., & Montenegro-Gómez, S.-P. (2019). The phyllosphere microbiome and its potential application in horticultural crops. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 13(3), 384–396. <https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13i3.8405>
- Bastida, F., Torres, I. F., Hernández, T., & García, C. (2017). The impacts of organic amendments: Do they confer stability against drought on the soil microbial community? *Soil Biology and Biochemistry*, 113, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.012>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bernaola, L., Cange, G., Way, M. O., Gore, J., Hardke, J., & Stout, M. (2018). Natural Colonization of Rice by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Different Production Areas.

- Rice Science*, 25(3), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.02.006>
- Berry, D., & Widder, S. (2014). Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00219>
- Bhattacharyya, P., & Barman, D. (2018). Crop Residue Management and Greenhouse Gases Emissions in Tropical Rice Lands. *Soil Management and Climate Change: Effects on Organic Carbon, Nitrogen Dynamics, and Greenhouse Gas Emissions*, 323–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812128-3.00021-5>
- Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, 101(13), 4767–4774. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>
- Bissett, A., Brown, M. V., Siciliano, S. D., & Thrall, P. H. (2013). Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: Towards a systems approach. *Ecology Letters*, 16(SUPPL.1), 128–139. <https://doi.org/10.1111/ele.12109>
- Blaud, A., Menon, M., van der Zaan, B., Lair, G. J., & Banwart, S. A. (2017). Effects of Dry and Wet Sieving of Soil on Identification and Interpretation of Microbial Community Composition. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 142). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.10.006>
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., & Weber, T. (2019). AntiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Böhme, L., Langer, U., & Böhme, F. (2005). Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109(1–2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.01.017>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borsetto, C., Amos, G. C. A., Da Rocha, U. N., Mitchell, A. L., Finn, R. D., Laidi, R. F.,

- Vallin, C., Pearce, D. A., Newsham, K. K., & Wellington, E. M. H. (2019). Microbial community drivers of PK/NRP gene diversity in selected global soils. *Microbiome*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0692-8>
- Bowles, T. M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F., & Jackson, L. E. (2014). Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.004>
- Boyce, R., Chilana, P., & Rose, T. M. (2009). iCODEHOP: A new interactive program for designing COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp379>
- 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(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00752>
- Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J., & Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 16(2), 29–37. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj016>
- Brown, M. V., Philip, G. K., Bunge, J. A., Smith, M. C., Bissett, A., Lauro, F. M., Fuhrman, J. A., & Donachie, S. P. (2009). Microbial community structure in the North Pacific ocean. *ISME Journal*, 3(12), 1374–1386. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.86>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., & Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- 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>

- Carreño-Carreño, J. del P. (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* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76023/1018449897.2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrión, V. J., Perez-Jaramillo, J., Cordovez, V., Tracanna, V., De Hollander, M., Ruiz-Buck, D., Mendes, L. W., van Ijcken, W. F. J., Gomez-Exposito, R., Elsayed, S. S., Mohanraju, P., Arifah, A., van der Oost, J., Paulson, J. N., Mendes, R., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Raaijmakers, J. M. (2019). Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science*, *366*(6465), 606–612. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9285>
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nieves, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Zorita, M. D., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, *56*(4), 461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Castilla, A. (2012). Manejo productivo de los residuos de la cosecha de arroz. *Revista Arroz*, *60*(500), 10–17.
- Characterization, S., & Turbe-doan, A. (2019). *crossm Quinone-Dependent Member of Auxiliary Activity Family 12 of the Carbohydrate-Active Enzymes Database: Functional and*. *85*(24), 1–15.
- Chaudhari, P. R., Ahire, D. V., Ahire, V. D., Chkravarty, M., & Maity, S. (2013). Soil Bulk Density as related to Soil Texture, Organic Matter Content and available total Nutrients of Coimbatore Soil. *International Journal of Scientific and Research Publications*, *3*(1), 2250–3153. [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
- Chen, S., Zheng, X., Wang, D., Chen, L., Xu, C., & Zhang, X. (2012). *Effect of Long-Term Paddy-Upland Yearly Rotations on Rice ( Oryza sativa ) Yield , Soil Properties , and Bacteria Community Diversity*. 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/279641>
- Chen, X., Jiang, N., Chen, Z., Tian, J., Sun, N., Xu, M., & Chen, L. (2017). Response of soil phoD phosphatase gene to long-term combined applications of chemical fertilizers and organic materials. *Applied Soil Ecology*, *119*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.019>
- Chhabra, V., & Mehta, C. M. (2019). Rice straw management for sustainable agriculture-a review. *Plant Archives*, *19*, 47–49.

- Chialva, M., Ghignone, S., Cozzi, P., Lazzari, B., Bonfante, P., Abbruscato, P., & Lumini, E. (2020). Water management and phenology influence the root-associated rice field microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa146>
- Chivenge, P., Rubianes, F., Chin, D. Van, & Thach, T. Van. (2020). Sustainable Rice Straw Management. In M. Gummert, N. Van Hung, P. Chivenge, & B. Douthwaite (Eds.), *Sustainable Rice Straw Management*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-32373-8>
- Choi, J., Bach, E., Lee, J., Flater, J., Dooley, S., Howe, A., & Hofmockel, K. S. (2018). Spatial structuring of cellulase gene abundance and activity in soil. *Frontiers in Environmental Science*, 6(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00107>
- Cimermancic, P., Medema, M. H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, L. C., Mavrommatis, K., Pati, A., Godfrey, P. A., Koehrsen, M., Clardy, J., Birren, B. W., Takano, E., Sali, A., Lington, R. G., & Fischbach, M. A. (2014). Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell*, 158(2), 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.034>
- Cleveland, C. C., Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., & Townsend, A. R. (2007). Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. *Biogeochemistry*, 82(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s10533-006-9065-z>
- Conrad, R. (2007). Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy*, 96(07), 1–63. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(07\)96005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(07)96005-8)
- Conrad, R. (2009). The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.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>
- D'haeseleer, P., Gladden, J. M., Allgaier, M., Chain, P. S. G., Tringe, S. G., Malfatti, S. A., T., J., & Singer, S. W. (2013). *Proteogenomic Analysis of a Thermophilic Bacterial Consortium Adapted to Deconstruct Switchgrass*.
- Dai, Z., Liu, G., Chen, H., Chen, C., Wang, J., Ai, S., Wei, D., Li, D., Ma, B., Tang, C.,

- Brookes, P. C., & Xu, J. (2020). Long-term nutrient inputs shift soil microbial functional profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems. *ISME Journal*, *14*(3), 757–770. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0567-9>
- Das, A. C. (1963). Ecology of soil fungi of rice fields 1. Succession of fungi on rice roots 2. Association of soil fungi with organic matter. *Transactions of the British Mycological Society*, *46*(3), 431–443. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80037-6](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80037-6)
- Das, S., Bhattacharyya, P., & Adhya, T. K. (2011). Impact of elevated CO<sub>2</sub>, flooding, and temperature interaction on heterotrophic nitrogen fixation in tropical rice soils. *Biology and Fertility of Soils*, *47*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0496-2>
- de Souza, W. R. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. <https://doi.org/10.5772/54325>
- de Vries, M. (2018). *Functional and phylogenetic diversity of cellulase genes in agricultural soil under two different tillage treatments*. 1–166. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1437155/file.pdf>
- Debode, J., De Tender, C., Cremelie, P., Lee, A. S., Kyndt, T., Muylle, H., De Swaef, T., & Vandecasteele, B. (2018). Trichoderma-inoculated miscanthus straw can replace peat in strawberry cultivation, with beneficial effects on disease control. *Frontiers in Plant Science*, *9*(February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00213>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & 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>
- 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>
- Ding, L. J., Cui, H. L., Nie, S. A., Long, X. E., Duan, G. L., & Zhu, Y. G. (2019). Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *95*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz040>
- Dobermann, A., & Fairhurst, T. H. (2002). Rice straw management. *Better Crops International*, *16*(January), 7–11.
- Dobermann, Achim, & Fairhurst, T. (2000). *Arroz: Desórdenes Nutricionales y Manejo de*

*Nutrientes*. 214.

- Dotaniya, M. L., Aparna, K., Dotaniya, C. K., Singh, M., & Regar, K. L. (2018). Role of soil enzymes in sustainable crop production. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00033-5>
- Douglas, G., Maffei, V., Zaneveld, J., Yurgel, S., Brown, J., Taylor, C., Huttenhower, C., & Langille, M. (2019). PICRUST2: An improved and customizable approach for metagenome inference. *PICRUST2: An Improved and Extensible Approach for Metagenome Inference*, June, 672295. <https://doi.org/10.1101/672295>
- Draganova, D., Valcheva, I., & Kuzmanova, Y. (2019). *Effect of wheat straw and cellulose degrading fungi of genus Trichoderma on soil respiration and cellulase, betaglucosidase and soil carbon content*. January. <https://doi.org/10.15547/ast.2018.04.064>
- Dror, B., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2020). State-of-the-art methodologies to identify antimicrobial secondary metabolites in soil bacterial communities-A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 147(April). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107838>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Edwards, J. A., Santos-Medellín, C. M., Liechty, Z. S., Nguyen, B., Lurie, E., Eason, S., Phillips, G., & Sundaresan, V. (2018). Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biology*, 16(2), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003862>
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E911–E920. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1414592112>
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., Sundaresan, V., & Jeffery, L. D. (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–E920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Edwards, J., Santos-Medellín, C., Nguyen, B., Kilmer, J., Liechty, Z., Veliz, E., Ni, J.,

- Phillips, G., & Sundaresan, V. (2019). Soil domestication by rice cultivation results in plant-soil feedback through shifts in soil microbiota. *Genome Biology*, *20*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1825-x>
- Eichorst, S. A., & Kuske, C. R. (2012). Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(7), 2316–2327. <https://doi.org/10.1128/AEM.07313-11>
- Eichorst, S. A., Trojan, D., Roux, S., Herbold, C., Rattei, T., & Woebken, D. (2018). Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, *20*(3), 1041–1063. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>
- Eiland, F., Klamer, M., Lind, A. M., Leth, M., & Bååth, E. (2001). Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. *Microbial Ecology*, *41*(3), 272–280. <https://doi.org/10.1007/s002480000071>
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1977). Phosphates in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *9*(1969), 167–172.
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *20*(5), 601–606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1990). Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *22*(7), 891–897. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90126-K](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90126-K)
- Ekenler, M., & Tabatabai, M. A. (2003). Effects of liming and tillage systems on microbial biomass and glycosidases in soils. *Biology and Fertility of Soils*. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0664-8>
- Ekwue, E. I. (1990). Organic-matter effects on soil strength properties. *Soil and Tillage Research*, *16*(3), 289–297. [https://doi.org/10.1016/0167-1987\(90\)90102-J](https://doi.org/10.1016/0167-1987(90)90102-J)
- El-Sobky, E. S. E. A. (2017). Effect of burned rice straw, phosphorus and nitrogen fertilization on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Agricultural Sciences*, *62*(1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2017.05.007>
- Elsas, J. D. van, Trevors, J. T., Jansson, J. K., & Nannipieri, P. (2006). Modern Soil Microbiology. In J. D. van Elsas, J. T. Trevors, J. K. Jansson, & P. Nannipieri (Eds.), *Modern Soil Microbiology, Second Edition* (3rd Editio). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015201>
- Eyre, A. W., Wang, M., Oh, Y., & Dean, R. A. (2019). Identification and characterization of

- the core rice seed microbiome. In *Phytobiomes Journal* (Vol. 3, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-19-0009-R>
- FAOSTAT. (2020). *FAOSTAT*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>
- Fedearroz. (2020). *Fedearroz*. [http://www.fedearroz.com.co/new/apr\\_public.php](http://www.fedearroz.com.co/new/apr_public.php)
- Ferrando, L., & Fernández Scavino, A. (2015). Strong shift in the diazotrophic endophytic bacterial community inhabiting rice (*Oryza sativa*) plants after flooding. *FEMS Microbiology Ecology*, *91*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv104>
- Fierer, N., A. Bradford, M., & B. Jackson, R. (2007). TOWARD AN ECOLOGICAL CLASSIFICATION OF SOIL BACTERIA Edited by Foxit Reader. *Ecology*, *88*(6), 1354–1364.
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., & Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME Journal*, *6*(5), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.159>
- Fontaine, S., Mariotti, A., & Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: A question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, *35*(6), 837–843. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8)
- Frankenberger, W. T., & Bingham, F. T. (1982). Influence of Salinity on Soil Enzyme Activities. *Soil Science Society of America Journal*, *46*(6), 1173–1177. <https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600060011x>
- Fraser, T. D., Lynch, D. H., Bent, E., Entz, M. H., & Dunfield, K. E. (2015). Soil bacterial phoD gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management. *Soil Biology and Biochemistry*, *88*(May), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.04.014>
- 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>
- Gallardo, C. A., Baldrian, P., & López-mondéjar, R. (2020). *Litter-inhabiting fungi show high level of specialization towards biopolymers composing plant and fungal biomass*.
- Gallego, V., García, M. T., & Ventosa, A. (2005). *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 281–287. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63319-0>

- Garbeva, P., Van Elsas, J. D., & Van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and Soil*, 302(1–2), 19–32. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9432-0>
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(29), 243–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Gianfreda, L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 283–306. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162015005000022>
- Gianfreda, Liliana, Rao, M. A., Piotrowska, A., Palumbo, G., & Colombo, C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: Intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341(1–3), 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005>
- Good, A. I. J. (1953). Biometrika Trust The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters THE POPULATION FREQUENCIES OF SPECIES AND THE ESTIMATION OF POPULATION PARAMETERS. *Biometrika*, 40(3), 237–264.
- Grant, C., Bittman, S., Montreal, M., Plenchette, C., & Morel, C. (2005). Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1), 3–14. <https://doi.org/10.4141/P03-182>
- Gredner, B. (2010). Effect of rice straw application on hydrolytic enzyme activities in Chinese paddy soils. *World*, August, 13–16.
- Grum-Grzhimaylo, A. A., Georgieva, M. L., Bondarenko, S. A., Debets, A. J. M., & Bilanenko, E. N. (2016). On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity*, 76(1), 27–74. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0320-2>
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2331-y>
- Guo, B., Liang, Y., Li, Z., & Han, F. (2009). Phosphorus adsorption and bioavailability in a paddy soil amended with pig manure compost and decaying rice straw. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(13–14), 2185–2199. <https://doi.org/10.1080/00103620902960666>
- Guo, T., Zhang, Q., Ai, C., Liang, G., He, P., Lei, Q., & Zhou, W. (2020). Analysis of

- microbial utilization of rice straw in paddy soil using a DNA-SIP approach. *Soil Science Society of America Journal*, *84*(1), 99–114. <https://doi.org/10.1002/saj2.20019>
- 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*, *12*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20293-5>
- Gupta, P. K., Sahai, S., Singh, N., Dixit, C. K., Singh, D. P., Sharma, C., Tiwari, M. K., Gupta, R. K., & Garg, S. C. (2004). Residue burning in rice-wheat cropping system: Causes and implications. *Current Science*, *87*(12), 1713–1717.
- Gweon, H. S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D. S., Griffiths, R. I., & Schonrogge, K. (2015). PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*(8), 973–980. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12399>
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *NRC Canada Can. J. Microbiol*, *43*, 895–914. [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com)
- Ham, J. H., Melanson, R. A., & Rush, M. C. (2011). Burkholderia glumae: Next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology*, *12*(4), 329–339. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00676.x>
- Han, Q., Ma, Q., Chen, Y., Tian, B., Xu, L., Bai, Y., Chen, W., & Li, X. (2020). Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean. *ISME Journal*, *14*(8), 1915–1928. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0648-9>
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, *77*(1), 154–164. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01092.x>
- He, J. Z., Liu, X. Z., Zheng, Y., Shen, J. P., & Zhang, L. M. (2010). Dynamics of sulfate reduction and sulfate-reducing prokaryotes in anaerobic paddy soil amended with rice straw. *Biology and Fertility of Soils*, *46*(3), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0426-3>
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-cournane, F., & Taylor, M. (2017). crossm Condition. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(1), 1–13.

- Hernández León, F. A. (2016). VARIEDAD FL - FEDEARROZ 68 EN LA ZONA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES DE LA DEL ARIARI-META. *REVISTA ARROZ*, 64(521), 4–12. <http://www.fedearroz.com.co/revistanew/arroz521.pdf>
- Hernández, M., Dumont, M. G., Yuan, Q., & Conrad, R. (2015). Different bacterial populations associated with the roots and rhizosphere of rice incorporate plant-derived carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2244–2253. <https://doi.org/10.1128/AEM.03209-14>
- Hesse, C. N., Mueller, R. C., Vuyisich, M., Gallegos-Graves, L. V., Gleasner, C. D., Zak, D. R., & Kuske, C. R. (2015). Forest floor community metatranscriptomes identify fungal and bacterial responses to N deposition in two maple forests. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00337>
- HilleRisLambers, J., Adler, P. B., Harpole, W. S., Levine, J. M., & Mayfield, M. M. (2012). Rethinking community assembly through the lens of coexistence theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 227–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110411-160411>
- Holtmark, I., Eijsink, V. G. H., & Brurberg, M. B. (2008). Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 280(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01010.x>
- Hong, S.-B., Kim, D.-H., Park, I.-C., Samson, R. A., & Shin, H.-D. (2010). Isolation and Identification of *Aspergillus Section Fumigati* Strains from Arable Soil in Korea . *Mycobiology*, 38(1), 1. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.1.001>
- Hori, T., Müller, A., Igarashi, Y., Conrad, R., & Friedrich, M. W. (2010). Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by 13 C-acetate probing. *ISME Journal*, 4(2), 267–278. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.100>
- Huang, L., Zhang, H., Wu, P., Entwistle, S., Li, X., Yohe, T., Yi, H., Yang, Z., & Yin, Y. (2018). dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D516–D521. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx894>
- Hubell, S. (2006). Neutral theory and the evolution of ecological equivalence. *Ecology*, 87(6), 1387–1398.
- Huhndorf, S. M., Miller, A. N., & Fernández, F. A. (2004). Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia*, 96(2), 368–387. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832982>
- Hung, D. T., Hughes, H. J., Keck, M., & Sauer, D. (2019). Rice-residue management

- practices of smallholder farms in Vietnam and their effects on nutrient fluxes in the soil-plant system. *Sustainability (Switzerland)*, 11(6).  
<https://doi.org/10.3390/su11061641>
- Hung, N. Van, Maguyon-Detras, M. C., Migo, M. V., Quilloy, R., Balingbing, C., Chivenge, P., & Gummert, M. (2020). Rice Straw Overview: Availability, Properties, and Management Practices. *Sustainable Rice Straw Management*, 1–13.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-32373-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32373-8_1)
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research*, 17(3), 377–386.  
<https://doi.org/10.1101/gr.5969107>
- 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(2), 55–61.  
<https://doi.org/10.17221/390/2010-pse>
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Ichikawa, S., Nishida, A., Yasui, S., & Karita, S. (2017). Characterization of lignocellulose particles during lignocellulose solubilization by *Clostridium thermocellum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81(10), 2028–2033.  
<https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1364619>
- Imchen, M., Kumavath, R., Vaz, A. B. M., Góes-Neto, A., Barh, D., Ghosh, P., Kozyrovska, N., Podolich, O., & Azevedo, V. (2019). 16S rRNA Gene Amplicon Based Metagenomic Signatures of Rhizobiome Community in Rice Field During Various Growth Stages. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–15.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02103>
- Ito, O., Ella, E., & Kawano, N. (1999). Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice ecosystem. *Field Crops Research*, 64(1–2), 75–90.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00052-0)
- Ivanova, A. A., Zhelezova, A. D., Chernov, T. I., & Dedysh, S. N. (2020). Linking ecology and systematics of acidobacteria: Distinct habitat preferences of the Acidobacteriia and Blastocatellia in tundra soils. *PLoS ONE*, 15(3), 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230157>

- Jenkins M., B., Bexter L., L., Miles R. Jr., T., & Miles R., T. (1998). Combustion Properties of Biomass Flash. *Fuel Processing Technology*, 54, 17–46.
- Jia, Z., & Conrad, R. (2009). Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1658–1671. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01891.x>
- Jiang, X., Hou, X., Zhou, X., Xin, X., Wright, A., & Jia, Z. (2015). pH regulates key players of nitrification in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 81(November), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.025>
- Jiao, S., Xu, Y., Zhang, J., Hao, X., & Lu, Y. (2019). Core Microbiota in Agricultural Soils and Their Potential Associations with Nutrient Cycling. *MSystems*, 4(2), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00313-18>
- Jiménez, D. J., Chaves-Moreno, D., & Van Elsas, J. D. (2015). Unveiling the metabolic potential of two soil-derived microbial consortia selected on wheat straw. *Scientific Reports*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep13845>
- Jiménez, D. J., de Lima Brossi, M. J., Schückel, J., Kračun, S. K., Willats, W. G. T., & van Elsas, J. D. (2016). Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics- and metasecretomics-based approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10463–10477. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7713-3>
- Jiménez, D. J., Dini-Andreote, F., & Van Elsas, J. D. (2014). Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-92>
- Jiménez, D. J., Korenblum, E., & Van Elsas, J. D. (2014). Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2789–2803. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5253-7>
- Jin, Z., Shah, T., Zhang, L., Liu, H., Peng, S., & Nie, L. (2020). *Effect of straw returning on soil organic carbon in rice – wheat rotation system : A review. December 2019*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/fes3.200>
- Kanasugi, M., Sarkodee-Addo, E., Omari, R. A., Dastogeer, K. M. G., Fujii, Y., Abebrese, S. O., Bam, R., Asuming-Brempong, S., & Okazaki, S. (2020). Exploring rice root microbiome; The variation, specialization and interaction of bacteria and fungi in six tropic Savanna Regions in Ghana. *Sustainability (Switzerland)*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/su12145835>

- 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>
- Kato, H., Mori, H., Maruyama, F., Toyoda, A., Oshima, K., Endo, R., Fuchu, G., Miyakoshi, M., Dozono, A., Ohtsubo, Y., Nagata, Y., Hattori, M., Fujiyama, A., Kurokawa, K., & Tsuda, M. (2015). Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Research*, 22(6), 413–424. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv023>
- Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2016). The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00744>
- Kielak, A. M., Cipriano, M. A. P., & Kuramae, E. E. (2016). Acidobacteria strains from subdivision 1 act as plant growth-promoting bacteria. *Archives of Microbiology*, 198(10), 987–993. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1260-2>
- Kim, H., & Lee, Y. H. (2020). The rice microbiome: A model platform for crop holobiome. *Phytobiomes Journal*, 4(1), 5–18. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-07-19-0035-RVW>
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Von Mering, C., & Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME Journal*, 6(7), 1378–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.192>
- Knoblauch R, Ernani PR, Deschamps FC, Gatiboni LC, Walker TW, Lourenço KS, A. A. & M. A. (2014). *RICE STRAW INCORPORATED JUST BEFORE SOIL FLOODING INCREASES ACETIC ACID FORMATION AND DECREASES AVAILABLE NITROGEN*. 38, 177–184.
- Kont, R., Kurašin, M., Teugas, H., & Väljamäe, P. (2013). Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-135>
- Kotur, Z., Siddiqi, Y. M., & Glass, A. D. M. (2013). Characterization of nitrite uptake in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for a nitrite-specific transporter. *New Phytologist*, 200(1), 201–210. <https://doi.org/10.1111/nph.12358>
- Kovaleva, O. L., Merkel, A. Y., Novikov, A. A., Baslerov, R. V., Toshchakov, S. V., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2015). *Tepidisphaera mucosa* gen. Nov., sp. nov., a moderately thermophilic member of the class phycisphaerae in the phylum Planctomycetes, and

- proposal of a new family, tepidisphaeraceae fam. nov., and a new order, Tepidisphaerales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 549–555. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070151-0>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kulichevskaya, I. S., Suzina, N. E., Liesack, W., & Dedysh, S. N. (2010). Bryobacter aggregatus gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemo-organotroph from subdivision 3 of the acidobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 301–306. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013250-0>
- Kumar, M., Kour, D., Yadav, A. N., Saxena, R., Rai, P. K., Jyoti, A., & Tomar, R. S. (2019). Biodiversity of methylotrophic microbial communities and their potential role in mitigation of abiotic stresses in plants. *Biologia*, 74(3), 287–308. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00190-6>
- Kumari, A., Kapoor, K. K., Kundu, B. S., & Mehta, R. K. (2008). Identification of organic acids produced during rice straw decomposition and their role in rock phosphate solubilization. *Plant, Soil and Environment*, 54(2), 72–77. <https://doi.org/10.17221/2783-pse>
- Kuramae, E. E., Hillekens, R. H. E., de Hollander, M., van der Heijden, M. G. A., van den Berg, M., van Straalen, N. M., & Kowalchuk, G. A. (2013). Structural and functional variation in soil fungal communities associated with litter bags containing maize leaf. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 519–531. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12080>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Kuzyakov, Y., & Blagodatskaya, E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry*, 83(February), 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- 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)
- Lanoiselet, V. M., Cother, E. J., Ash, G. J., Hind-Lanoiselet, T. L., Murray, G. M., & Harper, J. D. I. (2005). Prevalence and survival, with emphasis on stubble burning, of *Rhizoctonia* spp., causal agents of sheath diseases of rice in Australia. *Australasian*

- Plant Pathology*, 34(2), 135–142. <https://doi.org/10.1071/AP05010>
- Le Cocq, K., Gurr, S. J., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2017). Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 469–473. <https://doi.org/10.1111/mpp.12483>
- Le Roux, X., Poly, F., Currey, P., Commeaux, C., Hai, B., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schloter, M., Attard, E., & Klumpp, K. (2008). Effects of aboveground grazing on coupling among nitrifier activity, abundance and community structure. *ISME Journal*, 2(2), 221–232. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.109>
- Lee, J., & Cho, K. (2004). Relationships between methane production and sulfate reduction in reclaimed rice field soils. *Korean Journal of Biological Sciences*, 8(4), 281–288. <https://doi.org/10.1080/12265071.2004.9647761>
- Lee, Y. H., Ko, S. J., Cha, K. H., & Park, E. W. (2015). BGRcast: A disease forecast model to support decision-making for chemical sprays to control bacterial grain rot of rice. *Plant Pathology Journal*, 31(4), 350–362. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2015.0136>
- Li, H. Y., Wang, H., Wang, H. T., Xin, P. Y., Xu, X. H., Ma, Y., Liu, W. P., Teng, C. Y., Jiang, C. L., Lou, L. P., Arnold, W., Cralle, L., Zhu, Y. G., Chu, J. F., Gilbert, J. A., & Zhang, Z. J. (2018). The chemodiversity of paddy soil dissolved organic matter correlates with microbial community at continental scales. *Microbiome*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0561-x>
- Li, S., Wang, Z. hui, Miao, Y. fang, & Li, S. qing. (2014). Soil Organic Nitrogen and Its Contribution to Crop Production. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(10), 2061–2080. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60847-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60847-9)
- Li, X., Wang, H., Li, X., Li, X., & Zhang, H. (2019). Shifts in bacterial community composition increase with depth in three soil types from paddy fields in China. *Pedobiologia*, 77(February). <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2019.150589>
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., & Yao, H. (2018). Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 116(January), 290–301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.023>
- Liesack, W., Schnell, S., & Revsbech, N. P. (2000). Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 625–645. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00050-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00050-4)
- Lima-Mendez, G., Faust, K., Henry, N., Decelle, J., Colin, S., Carcillo, F., Chaffron, S.,

- Cesar Ignacio-Espinosa, J., Roux, S., Vincent, F., Bittner, L., Darzi, Y., Wang, J., Audic, S., Berline, L., Bontempi, G., Cabello, A. M., Coppola, L., Cornejo-Castillo, F. M., ... Raes, J. (2015). 24 Silvia G. Acinas, 12 Shinichi Sunagawa, 17 Peer Bork. *Science*, *10*(6237), 1–10. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Limmer, C., & Drake, H. L. (1996). Non-symbiotic N<sub>2</sub>-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)
- Lin, H. C., & Fukushima, Y. (2016). Rice cultivation methods and their sustainability aspects: Organic and conventional rice production in industrialized tropical monsoon Asia with a dual cropping system. *Sustainability (Switzerland)*, *8*(6). <https://doi.org/10.3390/su8060529>
- Lin, J. T., Goldman, B. S., & Stewart, V. (1993). Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Journal of Bacteriology*, *175*(8), 2370–2378. <https://doi.org/10.1128/jb.175.8.2370-2378.1993>
- Linhardt, R. J., Galliher, P. M., & Cooney, C. L. (1987). Polysaccharide lyases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *12*(2), 135–176. <https://doi.org/10.1007/BF02798420>
- Lou, Y., Xu, M., Wang, W., Sun, X., & Zhao, K. (2011). Return rate of straw residue affects soil organic C sequestration by chemical fertilization. *Soil and Tillage Research*, *113*(1), 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.still.2011.01.007>
- Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., Ackermann, M., Hahn, A. S., Srivastava, D. S., Crowe, S. A., Doebeli, M., & Parfrey, L. W. (2018). Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology and Evolution*, *2*(6), 936–943. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lozupone, C., Faust, K., Raes, J., Faith, J. J., Frank, D. N., Zaneveld, J., Gordon, J. I., & Knight, R. (2012). Identifying genomic and metabolic features that can underlie early successional and opportunistic lifestyles of human gut symbionts. *Genome Research*, *22*(10), 1974–1984. <https://doi.org/10.1101/gr.138198.112>
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T. G. Del, Edgar, R. C., Eickhorst, T.,

- Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, *488*(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Luo, G., Ling, N., Nannipieri, P., Chen, H., Raza, W., Wang, M., Guo, S., & Shen, Q. (2017). Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biology and Fertility of Soils*, *53*(4), 375–388. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1183-3>
- 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*(February), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20326>
- Lupatini, M., Suleiman, A. K. A., Jacques, R. J. S., Antonioli, Z. I., de Siqueira Ferreira, A., Kuramae, E. E., & Roesch, L. F. W. (2014). Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils. *Frontiers in Environmental Science*, *2*(MAY), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00010>
- Ma, B., Wang, Y., Ye, S., Liu, S., Stirling, E., Gilbert, J. A., Faust, K., Knight, R., Jansson, J. K., Cardona, C., Röttgers, L., & Xu, J. (2020). Earth microbial co-occurrence network reveals interconnection pattern across microbiomes. *Microbiome*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00857-2>
- Maarastawi, S. A., Frindte, K., Geer, R., Kröber, E., & Knief, C. (2018). Temporal dynamics and compartment specific rice straw degradation in bulk soil and the rhizosphere of maize. *Soil Biology and Biochemistry*, *127*, 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.028>
- 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*(JUN), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01295>
- Marentes, F., Vanegas, J., Luna, J. N., & Uribe-Vélez, D. (2011). *Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta* (D. Uribe-Vélez & L. M. Melgarejo (eds.); Primera ed). Editorial Universidad Nacional de Colombia. <https://www.uneditorial.com/ecologia-de-microorganismos-rizosfericos-asociados-a-cultivos-de-arroz-de-tolima-y-meta-agropecuaria.html>
- Margalef, O., Sardans, J., Fernández-Martínez, M., Molowny-Horas, R., Janssens, I. A.,

- Ciais, P., Goll, D., Richter, A., Obersteiner, M., Asensio, D., & Peñuelas, J. (2017). Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01418-8>
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N<sub>2</sub>fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes Journal*, 1(2), 70–82. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>
- Mašínová, T., Yurkov, A., & Baldrian, P. (2018). Forest soil yeasts: Decomposition potential and the utilization of carbon sources. *Fungal Ecology*, 34, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.03.005>
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Mekasha, S., Tuveng, T. R., Askarian, F., Choudhary, S., Schmidt-Dannert, C., Niebisch, A., Modregger, J., Vaaje-Kolstad, G., & Eijsink, V. G. H. (2020). A trimodular bacterial enzyme combining hydrolytic activity with oxidative glycosidic bond cleavage efficiently degrades chitin. *Journal of Biological Chemistry*, 295(27), 9134–9146. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.013040>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Merlin, C., Besaury, L., Niepceron, M., Mchergui, C., Riah, W., Bureau, F., Gattin, I., & Bodilis, J. (2014). Real-time PCR for quantification in soil of glycoside hydrolase family 6 cellulase genes. *Letters in Applied Microbiology*, 59(3), 284–291. <https://doi.org/10.1111/lam.12273>
- Midha, S., Bansal, K., Sharma, S., Kumar, N., Patil, P. P., Chaudhry, V., & Patil, P. B. (2016). Genomic resource of rice seed associated bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01551>

- Minamisawa, K., Imaizumi-Anraku, H., Bao, Z., Shinoda, R., Okubo, T., & Ikeda, S. (2016). Are symbiotic methanotrophs key microbes for N acquisition in paddy rice root? *Microbes and Environments*, 31(1), 4–10. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15180>
- Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9117-7>
- Müller, T., & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 2–17. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12198>
- Murase, J., Shibata, M., Lee, C. G., Watanabe, T., Asakawa, S., & Kimura, M. (2012). Incorporation of plant residue-derived carbon into the microeukaryotic community in a rice field soil revealed by DNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01224.x>
- Murillo-Antolinez, L. M. (2018). *2018\_Tesis final\_Laura Murillo*. UNiversidad El Bosque.
- Murphy, B. (2015). Key soil functional properties affected by soil organic matter - Evidence from published literature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 25(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/25/1/012008>
- NAAS. (2017). Innovative viable solution to rice residue burning in rice-wheat cropping system through concurrent use of super straw management system-fitted combines and turbo happy seeder. *Policy Brief No. 2*, 1–16. <http://naasindia.org/documents/CropBurning.pdf>
- 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>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2017). Landmark Papers Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 68(1), 12–26. [http://doi.wiley.com/10.1111/ejss.4\\_12398](http://doi.wiley.com/10.1111/ejss.4_12398)
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Fornasier, F., Moscatelli, M. C., & Marinari, S. (2012). Soil enzymology: Classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils*, 48(7), 743–762. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0723-0>
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). *Phosphorus in Action*. 26, 215–243. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>

- Nannipieri, Paolo. (2006). Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics. *Nucleic Acids and Proteins in Soil*, 8, 75–94. [https://doi.org/10.1007/3-540-29449-x\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-29449-x_4)
- Navarrete, Acácio A., Kuramae, E. E., de Hollander, M., Pijl, A. S., van Veen, J. A., & Tsai, S. M. (2013). Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 607–621. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12018>
- Navarrete, Acacio A., Tsai, S. M., Mendes, L. W., Faust, K., De Hollander, M., Cassman, N. A., Raes, J., Van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2015). Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology*, 24(10), 2433–2448. <https://doi.org/10.1111/mec.13172>
- Nelkner, J., Henke, C., Lin, T. W., Pätzold, W., Hassa, J., Jaenicke, S., Grosch, R., Pühler, A., Sczyrba, A., & Schlüter, A. (2019). Effect of long-term farming practices on agricultural soil microbiome members represented by metagenomically assembled genomes (MAGs) and their predicted plant-beneficial genes. *Genes*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/genes10060424>
- Nemergut, D. R., Townsend, A. R., Sattin, S. R., Freeman, K. R., Fierer, N., Neff, J. C., Bowman, W. D., Schadt, C. W., Weintraub, M. N., & Schmidt, S. K. (2008). The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: Implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3093–3105. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01735.x>
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J. S., & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Nicol, G. W., Leininger, S., Schleper, C., & Prosser, J. I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 10(11), 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
- Nie, San'an, Lei, X., Zhao, L., Brookes, P. C., Wang, F., Chen, C., Yang, W., & Xing, S. (2018). Fungal communities and functions response to long-term fertilization in paddy soils. *Applied Soil Ecology*, 130(August), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.008>
- Nie, San'An, Li, H., Yang, X., Zhang, Z., Weng, B., Huang, F., Zhu, G. B., & Zhu, Y. G.

- (2015). Nitrogen loss by anaerobic oxidation of ammonium in rice rhizosphere. *ISME Journal*, 9(9), 2059–2067. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.25>
- Nilsson, R. Henrik, Wurzbacher, C., Bahram, M., Coimbra, V. R. M., Larsson, E., Tedersoo, L., Eriksson, J., Ritter, C. D., Svantesson, S., Sánchez-García, M., Ryberg, M., Kristiansson, E., & Abarenkov, K. (2016). Top 50 most wanted fungi. *MycoKeys*, 12, 29–40. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.12.7553>
- Nilsson, Rolf Henrik, Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Nsenga Kumwimba, M., & Meng, F. (2019). Roles of ammonia-oxidizing bacteria in improving metabolism and cometabolism of trace organic chemicals in biological wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*, 659, 419–441. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.236>
- Pandey, A. K., Gaiind, S., Ali, A., & Nain, L. (2009). Effect of bioaugmentation and nitrogen supplementation on composting of paddy straw. *Biodegradation*, 20(3), 293–306. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9221-3>
- Pandit, P. S., Ranade, D. R., Dhakephalkar, P. K., & Rahalkar, M. C. (2016). A pmoA-based study reveals dominance of yet uncultured Type I methanotrophs in rhizospheres of an organically fertilized rice field in India. *3 Biotech*, 6(2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0453-3>
- Panhwar, Q. A., Naher, U. A., Shamshuddin, J., Othman, R., & Latif, M. A. (2014). Correction: Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
- Pansu, M., & Gautheyrou, J. (2006). Handbook of Soil Analysis. In *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-31211-6>
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123–3124. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>
- Pascualt, N., Ranjard, L., Kaisermann, A., Bachar, D., Christen, R., Terrat, S., Mathieu, O.,

- Lévêque, J., Mougél, C., Henault, C., Lemanceau, P., Péan, M., Boiry, S., Fontaine, S., & Maron, P. A. (2013). Stimulation of Different Functional Groups of Bacteria by Various Plant Residues as a Driver of Soil Priming Effect. *Ecosystems*, *16*(5), 810–822. <https://doi.org/10.1007/s10021-013-9650-7>
- Paul, E. A., & Clark, F. E. (1989). *Soil Microbiology and Biochemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02814-1>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Buitinck, L., Louppe, G., Grisel, O., & Mueller, A. (2015). Scikit-learn. *GetMobile: Mobile Computing and Communications*, *19*(1), 29–33. <https://doi.org/10.1145/2786984.2786995>
- Phy, C., Dejbhimon, K., Tulaphitak, D., Lawongsa, P., Thammasom, N., & Saenjan, P. (2014). *Rice Straw Amendment and Sulfate Affecting Methane Production and Chemical Properties in Paddy Soils*.
- Piotrowska, A., & Koper, J. (2010). Soil  $\beta$ -glucosidase activity under winter wheat cultivated in crop rotation systems depleting and enriching the soil in organic matter. *Journal of Elementology*, *15*(3), 593–600. <https://doi.org/10.5601/jelem.2010.15.3.593-600>
- Piotrowska, A., & Koper, J. (2013). Soil  $\beta$ -glucosidase activity under winter wheat cultivated in crop rotation systems depleting and enriching the soil in organic matter. *Journal of Elemntology*, *15*(3/2010), 593–600. <https://doi.org/10.5601/jelem.2010.15.3.593-600>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2018/6280484>
- Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, *152*(1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4)
- Power, M. E., Tilman, D., Estes, J. A., Menge, B. A., Bond, W. J., Mills, L. S., Daily, G., Castilla, J. C., Lubchenco, J., & Paine, R. T. (1996). Challenges in the Quest for Keystones. *BioScience*, *46*(8), 609–620. <https://doi.org/10.2307/1312990>
- Prosser, J. I., & Nicol, G. W. (2012). Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: The quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology*, *20*(11), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.001>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Quevedo Amaya, Y. M., Beltrán Medina, J. I., & Barragán Quijano, E. (2019). Identification of climatic and physiological variables associated with rice (*Oryza sativa* L.) yield under tropical conditions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(1), 8699–8706. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.72076>
- R Core Team. (2019). R: The R Project for Statistical Computing. In *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.r-project.org/>
- Ragot, S. A., Kertesz, M. A., & Bünemann, E. K. (2015). phoD alkaline phosphatase gene diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7281–7289. <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-15>
- Rawat, S. R., Männistö, M. K., Bromberg, Y., & Häggblom, M. M. (2012). Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 341–355. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01381.x>
- Rawway, M., Ali, S. G., & Badawy, A. S. (2018). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Different Sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6(1), 15–24. <https://doi.org/10.18576/jehe/060103>
- Reay, D. S., & Nedwell, D. B. (2004). Methane oxidation in temperate soils: Effects of inorganic N. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(12), 2059–2065. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.06.002>
- Reicosky, D. C., & Wilts, A. R. (2005). CROP-RESIDUE MANAGEMENT. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 4, 334–338. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00254-X>
- Ren, Z., You, W., Wu, S., Poetsch, A., & Xu, C. (2019). Secretomic analyses of *Ruminiclostridium papyrosolvans* reveal its enzymatic basis for lignocellulose degradation. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1522-8>
- Rho, M., Tang, H., & Ye, Y. (2010). FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq747>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016(10), 1–22.

<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

- Roman-Reyna, V., Pinili, D., Borja, F. ., I.L., Q., & S.C., G. (2019). *The rice leaf microbiome has a conserved community structure controlled by complex host-microbe interactions*.
- Rovira, P., & Ramón Vallejo, V. (2002). Mineralization of carbon and nitrogen from plant debris, as affected by debris size and depth of burial. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 327–339. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00186-9)
- S. P. DENG and M. A. TABATABAI. (1994). Cellulase Activity. *International Cenological Codex*, 26(1990), 1–11.
- Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T., & Osaki, M. (2008). Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 62–71. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00210.x>
- Salazar, S., Sánchez, L. E., Alvarez, J., Valverde, A., Galindo, P., Igual, J. M., Peix, A., & Santa-Regina, I. (2011). Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*, 37(8), 1123–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.02.007>
- Santos-Medellín, C., Edwards, J., Liechty, Z., Nguyen, B., & Sundaresan, V. (2017). Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of. *MBio*, 8(4): e00764-17), 1–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28720730><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5516253>
- Sarkodee-Addo, E., Yasuda, M., Lee, C. G., Kanasugi, M., Fujii, Y., Omari, R. A., Abebrese, S. O., Bam, R., Asuming-Brempong, S., Golam Dastogeer, K. M., & Okazaki, S. (2020). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Rice (*Oryza sativa* L.) in Ghana: Effect of regional locations and soil factors on diversity and community assembly. *Agronomy*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy10040559>
- Schimel, J. P., & Bennett, J. B. (2004). Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology*, 85(3), 591–602. <https://doi.org/10.1890/03-8024>
- Schinner, F., & Mersi, W. V. O. N. (1990). *and Invertase Activity in Soil: an Improved Method*. 3–7.
- Schinner, F., & von Mersi, W. (1990). Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil: An improved method. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(4), 511–515. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90187-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90187-5)

- Schöner, T. A., Gassel, S., Osawa, A., Tobias, N. J., Okuno, Y., Sakakibara, Y., Shindo, K., Sandmann, G., & Bode, H. B. (2016). Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. *ChemBioChem*, 17(3), 247–253. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500474>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzmán, Y., Dendooven, L., & Luna-Guido, M. (2014). Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere*, 24(3), 291–307. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3)
- Sessitsch, A., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A., Woyke, T., Mitter, B., Hauberg-Lotte, L., Friedrich, F., Rahalkar, M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., Van Overbeek, L., Brar, D., Van Elsas, J. D., & Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 28–36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0204>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shade, A., Jacques, M. A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B. H., Matulich, K. L., Schmidt, T. M., & Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(4), 623–656. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb00917.x>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete

- Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Sharrar, A. M., Crits-Christoph, A., Méheust, R., Diamond, S., Starr, E. P., & Banfield, J. F. (2020). Bacterial Secondary Metabolite Biosynthetic Potential in Soil Varies with Phylum, Depth, and Vegetation Type. *MBio*, 11(3), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00416-20>
- Shew, A. M., Durand-morat, A., Nalley, L. L., Zhou, X., Rojas, C., & Greg, T. (2019). *Warming increases Bacterial Panicle Blight ( Burkholderia glumae ) occurrences and impacts on USA rice production.* 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219199>
- Shiau, Y. J., Lin, C. W., Cai, Y., Jia, Z., Lin, Y. Te, & Chiu, C. Y. (2020). Niche differentiation of active methane-oxidizing bacteria in estuarine mangrove forest soils in taiwan. *Microorganisms*, 8(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081248>
- Simonet, P., Grosjean, M. C., Misra, A. K., Nazaret, S., Cournoyer, B., & Normand, P. (1991). Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3278–3286. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3278-3286.1991>
- Sinclair, L., Osman, O. A., Bertilsson, S., & Eiler, A. (2015). Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS ONE*, 10(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116955>
- Snedecor, G. W. (George W., & Cochran, W. G. (William G. (1989). *Statistical methods.* Iowa State University Press.
- Sneh Goyal & S.S. Sindhu. (2011). *Composting of rice straw using different inocula and analysi of compost quality* (pp. 126–138).
- Song, N., Xu, H., Yan, Z., Yang, T., Wang, C., & Jiang, H. L. (2019). Improved lignin degradation through distinct microbial community in subsurface sediments of one eutrophic lake. *Renewable Energy*, 138(February), 861–869. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.121>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., & Sheteiwiy, M. S. (2020). *Trichoderma : The “ Secrets ” of a Multitalented.*
- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundaresan, V., & Bais, H. (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-130>
- Sterkenburg, E., Bahr, A., Brandström Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2015). Changes in fungal communities along a boreal forest soil fertility gradient. *New Phytologist*, 207(4), 1145–1158. <https://doi.org/10.1111/nph.13426>

- Subramanian, S., & Smith, D. L. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – From an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00909>
- Sugano, A., Tsuchimoto, H., Tun, C. C., Asakawa, S., & Kimura, M. (2005). Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in rice straw incorporated into a rice field: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53(5), 585–594. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00187.x>
- Suleiman, A. K. A., Gonzatto, R., Aita, C., Lupatini, M., Jacques, R. J. S., Kuramae, E. E., Antonioli, Z. I., & Roesch, L. F. W. (2016). Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.002>
- Sutherland, I. W. (1995). Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(4), 323–347. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(95\)00020-D](https://doi.org/10.1016/0168-6445(95)00020-D)
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- TAKEUCHI, S. (1987). Importance and problems of disposal of crop residues containing pathogens of plant diseases. *JARQ. Japan Agricultural Research Quarterly*, 21(2), 102–108.
- Tarafdar, J. C., Yadav, R. S., & Meena, S. C. (2001). Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(3), 279–282. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200106\)164:3<279::AID-JPLN279>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200106)164:3<279::AID-JPLN279>3.0.CO;2-L)
- The CAZypedia Consortium, Davies, G., Gilbert, H., Henrissat, B., Svensson, B., Vocadlo, D., & Williams, S. (2018). Ten years of CAZypedia: A living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3–8. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx089>
- Tian, J., Dippold, M., Pausch, J., Blagodatskaya, E., Fan, M., Li, X., & Kuzyakov, Y. (2013). Microbial response to rhizodeposition depending on water regimes in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.021>
- Tipayarom, D., & Oanh, N. T. K. (2007). Effects from open rice straw burning emission on air quality in the Bangkok metropolitan region. *ScienceAsia*, 33(3), 339–345.

- <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.339>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P., & Carro, L. (2015). Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology*, *6*(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01341>
- Tung, N. S., Cu, N. X., & Hai, N. X. (2016). ARPN Journal of Agricultural and Biological Science IMPACT OF RICE STRAW BURNING METHODS ON SOIL TEMPERATURE AND MICROORGANISM IMPACT OF RICE STRAW BURNING METHODS ON SOIL TEMPERATURE AND MICROORGANISM DISTRIBUTION. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science I*, *23*(4), 157–160.
- Utobo, E. B., & Tewari, L. (2015). Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Applied Ecology and Environmental Research*, *13*(1), 147–169. [https://doi.org/10.15666/aeer/1301\\_147169](https://doi.org/10.15666/aeer/1301_147169)
- Vaksmaa, A., van Alen, T. A., Ettwig, K. F., Lupotto, E., Valè, G., Jetten, M. S. M., & Lüke, C. (2017). Stratification of diversity and activity of methanogenic and methanotrophic microorganisms in a nitrogen-fertilized Italian paddy soil. *Frontiers in Microbiology*, *8*(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02127>
- Van Bruggen, A. H. C., & Semenov, A. M. (2000). In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, *15*(1), 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00068-8)
- van der Lelie, D., Taghavi, S., McCorkle, S. M., Li, L. L., Malfatti, S. A., Monteleone, D., Donohoe, B. S., Ding, S. Y., Adney, W. S., Himmel, M. E., & Tringe, S. G. (2012). The metagenome of an anaerobic microbial community decomposing poplar wood chips. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036740>
- Van Groenigen, K. J., Osenberg, C. W., & Hungate, B. A. (2011). Increased soil emissions of potent greenhouse gases under increased atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature*, *475*(7355), 214–216. <https://doi.org/10.1038/nature10176>
- Vanegas, J., Landazabal, G., Melgarejo, L. M., Beltran, M., & Uribe-Vélez, D. (2013). Structural and functional characterization of the microbial communities associated with the upland and irrigated rice rhizospheres in a neotropical Colombian savannah. *European Journal of Soil Biology*, *55*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.10.008>

- Veres, Z., Kotroczó, Z., Fekete, I., Tóth, J. A., Lajtha, K., Townsend, K., & Tóthmérész, B. (2015). Soil extracellular enzyme activities are sensitive indicators of detrital inputs and carbon availability. *Applied Soil Ecology*, *92*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.03.006>
- Viborg, A. H., Terrapon, N., Lombard, V., Michel, G., Czjzek, M., Henrissat, B., & Brumer, H. (2019). A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). *Journal of Biological Chemistry*, *294*(44), 15973–15986. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010619>
- 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>
- Walsh, E., & McDonnell, K. P. (2012). The influence of added organic matter on soil physical, chemical, and biological properties: A small-scale and short-time experiment using straw. *Archives of Agronomy and Soil Science*, *58*(SUPPL.), 17–20. <https://doi.org/10.1080/03650340.2012.697999>
- Wang, M., Eyre, A. W., Thon, M. R., Oh, Y., & Dean, R. A. (2020). Dynamic Changes in the Microbiome of Rice During Shoot and Root Growth Derived From Seeds. *Frontiers in Microbiology*, *11*(September), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.559728>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(16), 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, W., Luo, X., Chen, Y., Ye, X., Wang, H., Cao, Z., Ran, W., & Cui, Z. (2019). Succession of composition and function of soil bacterial communities during key rice growth stages. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00421>
- Wang, Y., Xu, L., Gu, Y. Q., & Coleman-Derr, D. (2016). MetaCoMET: A web platform for discovery and visualization of the core microbiome. *Bioinformatics*, *32*(22), 3469–3470. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw507>
- Waqas, M., Khan, A. L., & Lee, I. J. (2014). Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 478–487. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.860562>
- Watanabe, T., Luu, H. M., Nguyen, N. H., Ito, O., & Inubushi, K. (2013). Combined effects of the continual application of composted rice straw and chemical fertilizer on rice yield

- under a double rice cropping system in the Mekong Delta, Vietnam. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 47(4), 397–404. <https://doi.org/10.6090/jarq.47.397>
- 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>
- Williams, R. J., Howe, A., & Hofmockel, K. S. (2014). Demonstrating microbial co-occurrence pattern analyses within and between ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00358>
- Wilson, G. W. T., Rice, C. W., Rillig, M. C., Springer, A., & Hartnett, D. C. (2009). Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: Results from long-term field experiments. *Ecology Letters*, 12(5), 452–461. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x>
- Wongwilaiwalin, S., Laothanachareon, T., Mhuantong, W., Tangphatsornruang, S., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., & Champreda, V. (2013). Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8941–8954. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4699-y>
- Wu, Y., Zaiden, N., & Cao, B. (2018). The core- and pan-genomic analyses of the genus *Comamonas*: From environmental adaptation to potential virulence. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03096>
- Yadav, R., & Tarafdar, J. (2001). Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils*, 34(3), 140–143. <https://doi.org/10.1007/s003740100376>
- Yadvinder-Singh, Bijay-Singh, & Timsina, J. (2005). Crop Residue Management for Nutrient Cycling and Improving Soil Productivity in Rice-Based Cropping Systems in the Tropics. *Advances in Agronomy*, 85, 269–407. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(04\)85006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(04)85006-5)
- Yao, H., Chen, X., Yang, J., Li, J., Hong, J., Hu, Y., & Mao, X. (2020). Effects and mechanisms of phosphate activation in paddy soil by phosphorus activators. *Sustainability (Switzerland)*, 12(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/su12093917>
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). DbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), 445–451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>
- Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S., & Senoo, K. (2009). Temporal shifts in diversity and

- quantity of nirS and nirK in a rice paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2044–2051. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.07.012>
- Young and Crawford. (2004). *Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex*. Author(s): I. M. Young and J. W. Crawford. Published by: American Association for the Advancement of Science. Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/3837024>. 304(5677), 1634–1637.
- Yu, Y., Wu, M., Petropoulos, E., Zhang, J., Nie, J., Liao, Y., Li, Z., Lin, X., & Feng, Y. (2019). Responses of paddy soil bacterial community assembly to different long-term fertilizations in southeast China. *Science of the Total Environment*, 656, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.359>
- Yuan, C. L., Zhang, L. M., Wang, J. T., Hu, H. W., Shen, J. P., Cao, P., & He, J. Z. (2019). Distributions and environmental drivers of archaea and bacteria in paddy soils. *Journal of Soils and Sediments*, 19(1), 23–37. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-1997-0>
- Yuan, C., Zhang, L., Hu, H., Wang, J., Shen, J., & He, J. (2018). The biogeography of fungal communities in paddy soils is mainly driven by geographic distance. *Journal of Soils and Sediments*, 18(5), 1795–1805. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-1924-4>
- Zang, X., Liu, M., Fan, Y., Xu, J., Xu, X., & Li, H. (2018). The structural and functional contributions of  $\beta$ -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1045-8>
- Zhan, Y., Liu, W., Bao, Y., Zhang, J., Petropoulos, E., Li, Z., Lin, X., & Feng, Y. (2018). Fertilization shapes a well-organized community of bacterial decomposers for accelerated paddy straw degradation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26375-8>
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., Busk, P. K., Xu, Y., & Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W95–W101. <https://doi.org/10.1093/nar/gky418>
- Zhang, L., Chen, W., Burger, M., Yang, L., Gong, P., & Wu, Z. (2015). Changes in soil carbon and enzyme activity as a result of different long-term fertilization regimes in a greenhouse field. *PLoS ONE*, 10(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118371>
- Zhang, L. M., Offre, P. R., He, J. Z., Verhamme, D. T., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010).

- Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17240–17245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004947107>
- Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Hirayama, K., Tanaka, K., Pointing, S. B., Spatafora, J. W., & Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: A taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology*, 64, 85–102. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.64.04>
- Zhao, X., Yuan, G., Wang, H., Lu, D., Chen, X., & Zhou, J. (2019). Effects of full straw incorporation on soil fertility and crop yield in rice-wheat rotation for silty clay loamy cropland. *Agronomy*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy9030133>
- Zheng, Y., Huang, R., Wang, B. Z., Bodelier, P. L. E., & Jia, Z. J. (2014). Competitive interactions between methane- and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil. *Biogeosciences*, 11(12), 3353–3368. <https://doi.org/10.5194/bg-11-3353-2014>
- Zhou-qi, C., Bo, Z., Guan-lin, X., Bin, L., & Shi-wen, H. (2016). Research Status and Prospect of Burkholderia glumae, the Pathogen Causing Bacterial Panicle Blight. *Rice Science*, 23(3), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.01.007>
- Zhou, J., Xue, K., Xie, J., Deng, Y., Wu, L., Cheng, X., Fei, S., Deng, S., He, Z., Van Nostrand, J. D., & Luo, Y. (2012). Microbial mediation of carbon-cycle feedbacks to climate warming. *Nature Climate Change*, 2(2), 106–110. <https://doi.org/10.1038/nclimate1331>
- Zhu, H., Wang, Z. X., Luo, X. M., Song, J. X., & Huang, B. (2014). Effects of straw incorporation on Rhizoctonia solani inoculum in paddy soil and rice sheath blight severity. *Journal of Agricultural Science*, 152(5), 741–748. <https://doi.org/10.1017/S002185961300035X>
- Zhu, L., Hu, N., Zhang, Z., Xu, J., Tao, B., & Meng, Y. (2015). Short-term responses of soil organic carbon and carbon pool management index to different annual straw return rates in a rice-wheat cropping system. *Catena*, 135, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.08.008>
- Žifčáková, L., Větrovský, T., Lombard, V., Henriessat, B., Howe, A., & Baldrian, P. (2017). Feed in summer, rest in winter: microbial carbon utilization in forest topsoil. *Microbiome*, 5(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0340-0>