



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“EFECTO DE PRÁCTICAS AGRÍCOLAS Y FERTILIZACIÓN
SOBRE MICROORGANISMOS NITRIFICANTES”**

Tesis que presenta:

Mario Hernández Guzmán

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de tesis:

**Dr. Luc Dendooven
Dra. Yendi E. Navarro-Noya**

México, D.F.

Marzo, 2022

Agradecimientos

- CONACyT: Por la beca otorgada para obtener el grado de doctor en ciencias en la especialidad en biotecnología en el centro de investigación y estudios avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN). Con número de becario: 306905.
- Dr. Luc Dendooven y Dra. Yendi E. Navarro Noya: Por su tiempo, guía y, sobre todo, por su paciencia. Gracias por ayudar en mi formación académica.
- Dr. Marco Licinio Luna Guido (a.k.a “doc mac” ó “Marquite”). Por su invaluable apoyo. Aprendí mucho de usted. Las risas, las horas de trabajo, y algunas de ocio. Nada de eso es para olvidarse. Un gusto coincidir con usted en el laboratorio. Le deseo lo mejor siempre. Muchas gracias por todo.
- A mis amigos y compañeros durante el desarrollo del trabajo y estancia en el laboratorio. Gracias Srita. M. Sc. Marcela Montoya (*chito mai*). Gracias a mis estudiantes de servicio social: Viri & Lalo, Pamela, Tessa, Alfredo. Les deseo el mejor de los éxitos a todos ustedes. Que sean felices.
- Maestro Néstor Hugo Cruz Pérez (a.k.a. @hugoainn). Mi estimado. Mi camarada. Gracias por todo. Ojalá nos espere una (s) buena (s) cerveza (s) dentro de unas cuantas décadas.

Dedicatorias

A mis padres. Soy y estoy gracias a ustedes. No podré pagarles tanto.

A Valentín. Por ser parte de mi familia; por elección. Por tu apoyo.

A mí mismo. Sigue echándole ganas. No dejes que tus monstruos ganen: ¡Nunca!

Contenido

Agradecimientos	i
Dedicatorias	ii
Abstract.....	vi
Resumen.....	vii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	3
2.1. La agricultura y fertilización inorgánica.....	3
2.2. La nitrificación y la agricultura	7
III. Justificación	13
IV. Hipótesis.....	14
V. Objetivos.....	14
5.1. Objetivo general.....	14
5.2. Objetivos particulares	14
VI. Capítulo I: Efecto de la adición de residuos de plantas de maíz sobre el metagenoma de un suelo con manejo de agricultura de conservación.	15
6.1. Introducción	15
6.2. Materiales y métodos	17
6.2.1. Sitio experimental.....	17
6.2.2. Muestreo y caracterización del suelo.....	18
6.2.3. Cultivo de plantas de maíz y experimento en microcosmos.....	18
6.2.4. Extracción y secuenciamiento directo del DNA.....	19
6.2.5. Análisis bioinformático: ensamble y anotación funcional.....	20
6.2.6. Análisis de la estructura microbiana del suelo.....	22
6.2.7. Análisis estadístico.....	22
6.3. Resultados.....	23
6.3.1. Análisis del microbioma del suelo y ensamble del metagenoma.....	23
6.3.2. Diversidad taxonómica	25
6.3.3. Estructura bacteriana del suelo	26
6.3.4. Estructura del dominio Arquea en el suelo	28
6.3.5. Comunidad de hongos del suelo	32
6.3.6. Comunidad de protistas en el suelo	33
6.3.7. Estructura viral de suelo	33
6.3.8. Análisis de la anotación funcional del metagenoma.....	34
6.3.9. Diversidad funcional del metagenoma del suelo	37
6.4. Discusión	38
6.4.1. Cambios en la composición bacteriana del suelo	39
6.4.2. Composición de arqueas en el suelo	42
6.4.3. Composición de la estructura de hongos del suelo	43
6.4.4. Estructural de la comunidad de protistas en el suelo	44
6.4.5. Estructura viral del suelo	45

6.4.6. Funcionalidad y diversidad del metagenoma.....	46
6.5. Conclusión	47
VII. Capítulo II. Ammonium alters the bacterial community structure in soil under different management practices: a laboratory study	49
7.1. Introducción	49
7.2. Materiales y métodos.....	50
7.2.1. Muestro y caracterización de suelos	50
7.2.2. Microcosmos: Diseño y dinámica experimental.....	51
7.2.3. Extracción de DNA total de suelo y amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA	52
7.2.4. Análisis bioinformático	53
7.2.5. Análisis estadístico.....	54
7.3. Resultados	55
7.3.1. Mineralización de carbono y nitrógeno	55
7.3.2. Resultado de la secuenciación y diversidad microbiana en el suelo.....	56
7.3.3. La estructura bacteriana del suelo definida por las prácticas agrícolas	57
7.3.4. La estructura bacteriana del suelo definida por la aplicación de 300 mg NH ₄ ⁺ kg ⁻¹	60
7.3.5. Análisis “in silico” del metagenoma del suelo: predicción funcional	61
7.4. Discusión	64
7.4.1. Mineralización de C y N	64
7.4.2. Diversidad bacteriana del suelo	65
7.4.3. Efecto de las prácticas y aplicación de amonio sobre la estructura bacteriana del suelo	66
7.4.4. Predicción funcional: metagenoma del suelo	67
7.5. Conclusión	68
8. Referencias.....	70

Lista de cuadros

Cuadro 1. Número de secuencias asignadas empleando Kraken2 y Bracken. _____	22
Cuadro 2. Resumen del ensamble del metagenoma. _____	24
Cuadro 3. Análisis diferencial de la composición bacteriana del suelo (aldex.kw) _____	60
Cuadro 4. Efecto de la aplicación de amonio (suelo sin adición y con adición de 300 mg NH ₄ ⁺ -N kg ⁻¹) sobre la estructura bacteriana a nivel de filos y géneros. _____	63

Lista de figuras

Figura 1. Eficiencia de uso de fertilizantes nitrogenados	6
Figura 2. Diagrama esquemático del ciclo del nitrógeno en la biósfera.....	9
Figura 3. Diagrama de la localización del campo experimental y esquema de camas permanentes	17
Figura 4. Diseño de la unidad experimental.	21
Figura 5. Flujo de análisis bioinformático del metagenoma.....	21
Figura 6. Distribución taxonómica del metagenoma del suelo.....	24
Figura 7. Curvas de rarefacción del número de OTUs	25
Figura 8. Diversidad taxonómica.....	27
Figura 9. Heatmap con las abundancias relativas (%) al nivel taxonómico de filo	28
Figura 10. Heatmap con las abundancias relativas (%) al nivel taxonómico de género.....	29
Figura 11. Análisis de abundancia diferencial con DESeq2 al nivel taxonómico de a) filo, y b) géneros bacterianos.....	29
Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos transformados de asignación taxonómica a nivel de filo o familias (virus).....	31
Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos transformados de los grupos microbianos a nivel de género	32
Figura 14. Categorías funcionales del metagenoma del suelo.....	35
Figura 15. Anotación funcional del metagenoma del suelo.....	36
Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) con los datos transformados (clr) de anotación funcional del metagenoma del suelo	37
Figura 17. Diversidad funcional del metagenoma del suelo.....	38
Figura 18. Dinámica acumulativa de CO ₂	56
Figura 19. Dinámica de mineralización de N	57
Figura 20. Heatmap con la abundancia relativa (%) de filos bacterianos.....	58
Figura 21. Análisis de componentes principales (PCA) y análisis multivariado con perMANOVA del efecto de la adición de amonio y prácticas agrícolas en la estructura bacteriana del suelo	59
Figura 22. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de las prácticas agrícolas (CT, PBB o PBC) y el tiempo (días) sobre los grupos asignados a nivel de género	62
Figura 23. Análisis de componentes principales (PCA) y perMANOVA del efecto la adición de amonio (suelo sin adición o con adición de 300 mg NH ₄ ⁺ -N kg ⁻¹ suelo), tiempo y su interacción en la estructura bacteriana a nivel de género	62
Figura 24. Análisis de componentes principales del efecto de las prácticas agrícolas y adición de NH ₄ ⁺ sobre a) las rutas metabólicas, y b) genes putativos del ciclo de N.....	64

Abstract

Soil is the basis of terrestrial ecosystems due to the different functions it performs, i.e. it is a physical support and provides nutrients for terrestrial plants and habitat for a large number of microorganisms. The soil microbiome, along with that of the aquatic systems, are responsible for the different processes that make up the biogeochemical cycles, of which the cycles of C and N stand out because of their higher importance. The natural N cycle has been disturbed by different activities inherent to human development: high population growth leads to a higher demand for agricultural products, and therefore the massive exploitation of soils, with the result of loss of ecosystems.

Excessive use of nitrogen fertilizers and conventional agricultural practices have altered the natural N cycle, compromise the resource and generate pollution to the environment (NO_3^- leaching and N_2O emissions). Land degradation due to conventional agricultural practices has led to the development of conservation agriculture, a sustainable alternative which is based on crop rotation, minimal soil disturbance and crop residues retention. However, it is known that the different agricultural practices have an effect on soil physicochemical characteristics and therefore on soil microbial communities.

It is important to understand the effect of agricultural practices and inorganic fertilization on the general ecosystem because it will allow us to explore and understand the functional and structural diversity of soil microbiome and its relationship with the global ecosystem functioning; that will lead us to the sustainable use of the soil.

Resumen

El suelo es la base de los ecosistemas terrestres debido a las diferentes funciones que realiza; es soporte físico, aporta nutrientes para las plantas terrestres y es hábitat para un gran número de microorganismos. El microbioma de los suelos junto con la de los sistemas acuáticos son los responsables de los ciclos biogeoquímicos en la biósfera; de éstos, es el ciclo del N que se ha perturbado por diferentes actividades inherentes al desarrollo humano. El crecimiento poblacional incrementa la demanda de productos agrícolas y esto a su vez la sobreexplotación de los suelos, y deforestación de ecosistemas. El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y las prácticas agrícolas convencionales alteran el ciclo, comprometen el recurso no renovable, y generan contaminación del medio ambiente. El deterioro debido a prácticas agrícolas convencionales ha llevado al desarrollo de la agricultura de conservación, alternativa sostenible que se basa en la rotación de cultivos, mínima perturbación del suelo y retención de residuos agrícolas.

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de más de veinte años de uso de la agricultura de conservación, así como el efecto de la fertilización inorgánica de los suelos sobre la dinámica de nitrógeno, y el microbioma de este. Los resultados mostraron que el uso de residuos agrícolas, el uso de fertilizantes, y el tipo de uso de suelo (practica convencional contra agricultura de conservación) impacta sobre el metagenoma del suelo, es decir, sobre el microbioma y la funcionalidad de éste.

En este sentido, es importante estudiar el efecto de las prácticas agrícolas en el ecosistema. Esto nos permitiría entender la dinámica y diversidad funcional y estructural de las comunidades microbianas residentes, y así guiarnos al uso sostenible del suelo.

I. Introducción

Los ciclos biogeoquímicos definen el curso de varios elementos vitales en el ecosistema, a saber, carbono (C), nitrógeno (N), azufre (S) y fósforo (P); siendo éstos la base química de los seres vivos. El ciclo del N juega un papel muy importante en la biósfera: es limitante del crecimiento de todos los organismos y está directamente relacionado con el metabolismo y ciclo del carbono, además de ser parte inherente de biomoléculas importantes. La proporción de N en la atmósfera es elevada (79% de la composición del aire), sin embargo, sólo puede ser metabolizado directamente por fijadores de N; grupo que reduce el N_2 y se encuentran en forma libre o formando simbiosis con ciertas plantas. La fijación es el paso limitante del ciclo, y los demás seres vivos dependen de él.

La importancia del ciclo radica en la diversidad de organismos que se asocian a él, como parte de una compleja interacción biológica (procariontes y eucariontes), y también por el efecto de sus productos. Los gases nitrogenados (NO_x) se relacionan con la salud del aire y la ionósfera (N_2O y NO), y sus derivados (NH_4^+ , NO_3^-) con la salud del agua (eutroficación). La eutroficación, el proceso de incremento de compuestos nitrogenados en cuerpos de agua (por razones naturales o antropogénicas), genera crecimiento acelerado de algas provocando la disminución del oxígeno disponible para el resto de los organismos en ecosistemas acuáticos, además de impedir el acceso de luz para los microorganismos fotosintéticos. En suelos, los estados inorgánicos del nitrógeno son elementos limitantes en el desarrollo vegetal, lo que está directamente ligado a la productividad de los cultivos en campos agrícolas.

Es en el suelo es donde se lleva a cabo la mayoría de los procesos que completan el ciclo: fijación biológica, nitrificación (oxidación de amonio a nitrito y a nitrato), asimilación, amonificación y desnitrificación (reducción de nitrato a nitrógeno molecular, N_2), incluidos los

procesos anaerobios (asimilación de nitrato a amonio y oxidación anaeróbica de amonio). En tal contexto, los procesos naturales de los ciclos de N y C se han visto seriamente perturbados producto del desarrollo humano, y el avance industrial y tecnológico.

Factores como el uso no sostenible del suelo, incremento en la población humana, uso excesivo de fertilizantes en la agricultura, y la interacción de éstos, lleva consigo la explotación del recurso natural no renovable, aumentando la cantidad de formas nitrogenadas y CO₂ en el ecosistema global. Lo anterior pone en juicio la seguridad alimentaria, la salud humana y ambiental.

II. Antecedentes

La agricultura sigue jugando un papel crucial en el desarrollo social, especialmente en países en desarrollo donde gran parte de la población depende económicamente de los ingresos que resultan del mercado agrícola. Fue cerca del año 1960 que dio inicio el movimiento “revolución verde”, cuyo avance fue gracias al uso de fertilizantes inorgánicos, basándose en la conclusión de obtener mayor productividad y el uso de variedades de cultivo. El uso masivo de fertilizantes dio un giro muy importante al desarrollo de la agricultura. Además del uso de fertilizantes, la idea de “irrigación”, amplió el área de suelo que antes no podía dedicarse a la agricultura. El crecimiento en la producción de alimentos a nivel mundial fue exponencial gracias a la revolución verde, y redujo drásticamente la falta de alimentos en varios países, especialmente en Asia ([Dethier and Effenberger, 2012](#)). Este movimiento no pudo haber sido posible sin el desarrollo del proceso de fijación abiótica de nitrógeno molecular a nivel industrial: el proceso Haber-Bosch, a través del cual se pudo suplir la demanda de fertilizantes durante el siglo anterior ([Erisman et al. 2008](#); [Kandemir et al. 2013](#))

2.1. La agricultura y fertilización inorgánica

El amoníaco (NH_3) es una de las moléculas más importantes y mayormente producidas a nivel mundial que juega un rol muy importante en el desarrollo social y su alimentación. Hasta el siglo XVIII se solían emplear fertilizantes orgánicos; fue luego de comprender que el N era un elemento limitante en el crecimiento y productividad de las plantas que la demanda de fertilizantes incrementó. En 1908, Fritz Haber publicó el proceso a través del cual sintetizaba NH_3 , a partir de sus elementos básicos: N molecular (N_2) e hidrógeno (H_2). En 1913, Carl Bosch

estableció el proceso industrial para producir fertilizantes inorgánicos (principalmente sulfato de amonio, $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$) a gran escala; proceso conocido como “Haber-Bosch” que se realiza a temperaturas que llegan a los 500 °C, y presiones de 200 atm (200 bar) (Erisman et al. 2008; Kandemir et al. 2013).

Gracias al proceso de Haber-Bosch, en el año 2013 se suplió con cerca de 136 millones de toneladas de fertilizantes inorgánicos, y en el 2016 con cerca de 194.1 millones de toneladas, cuya demanda está directamente relacionada con (i) el crecimiento poblacional mundial, que de acuerdo con la FAO (2009) se estimó en más de un tercio, es decir, que el número de personas alcanzaría entre los 9,100 y 9,700 millones, producto de los países en desarrollo; (ii) La demanda alimentaria mundial, que está a su vez relacionado con el crecimiento poblacional: Entre el año 2014 y 2017, la producción de cereales a nivel mundial incrementó en un 4%, pasando de 2,498 a 2,953 millones de toneladas. Este incremento lleva consigo el aumento en el uso de insumos y recursos naturales (FAO, 2015; 2017); (iii) Los tipos de cultivo, donde los cereales principales son el maíz, trigo y arroz: de acuerdo con Ladha et al. (2005) se requiere de 1 kg de N para poder producir 49 kg de maíz, 68 kg de arroz o 44 kg de trigo. Tal hecho permite dimensionar la necesidad de cantidades serias de fertilizante inorgánico en el campo para intentar suplir la demanda de alimentos.

Con dicho crecimiento poblacional, se estima que la producción de alimentos en estos países debe aumentar en un 70 % en el mismo período; es decir, la producción debe duplicarse (Blum, 2013; FAO, 2015). Esta estimación es menos de la mitad que lo reportado por Tilman et al. (2011), quienes demostraron la necesidad de un incremento de entre 100% y 110 % en la producción. Estos niveles de producción demanda, a su vez, mayor área de cultivo y mayor cantidad de fertilizantes inorgánicos. El escenario en el que la producción mundial se ve duplicada para el 2050 es serio, ya que la tendencia de crecimiento en el promedio anual mundial de la productividad de los cuatro cereales más importantes es de 1.6%, 1.0%, 0.9% y 1.3% para

maíz, arroz, trigo y soya, respectivamente; se necesitaría de un crecimiento de más del 2.4 % anual constante para poder siquiera alcanzar la producción necesaria estimada (Ray et al. 2013).

Con lo anterior, la solución para poder suplir la demanda alimentaria radica en incrementar el área destinada para cultivo actualmente, e incrementar el uso de fertilizantes, hecho que nos lleva a la deforestación y explotación masiva de suelo inminente y de manera acelerada (Ray et al. 2013), aunado a las consecuencias inherentes del uso de fertilizantes inorgánicos.

Si bien la agricultura es el medio a través del cual obtenemos un alto porcentaje de nuestra alimentación, es del suelo del que dependemos en un 95% (Arsenault, 2017). Las consecuencias del uso no sostenible de éste ha sido reportado ampliamente; los efectos pueden observarse en la pérdida de fertilidad, erosión, cambios en la textura y de pH, entre otros. La pérdida de calidad y productividad de los suelos se debe al hecho del deterioro apresurado debido a erosión, producto de la deforestación, el agotamiento de nutrientes y la pérdida de carbono orgánico en el mismo, aunado a prácticas no sostenibles de uso de suelo, hecho que atisba un problema serio.

La agricultura basada en el uso de fertilizantes inorgánicos es una de las prácticas agrícolas que ha superado la limitante de escasez de nitrógeno en el suelo en la producción de alimentos, e incrementando la productividad. Si bien las bondades en producción obtenidas son bien recibidas, las consecuencias son serias, y entre ellas se destacan:

- i) Contaminación de aguas subterráneas por lixiviación de NO_3^- .
- ii) Eutrofización de mantos y corrientes acuíferas, erosión, pérdida de superficies, pérdida de N del suelo.
- iii) Contaminación de la tropósfera, relacionado con la emisión de gases que afectan la capa de ozono (N_2O , NO), iv) lluvia ácida producto de gases como NO y volatilización y deposición de NH_3 , pérdida de NH_3 y acidificación del suelo.



Figura 1. Eficiencia de uso de fertilizantes nitrogenados (modificado de Zhang et al. (2015)).

Cada uno de los anteriores contribuye de manera significativa a la contaminación del ambiente, sin embargo, se sabe que la producción agrícola es el principal factor antropogénico que ha alterado al ciclo del nitrógeno (Knops and Tilman, 2000; Ladha et al. 2005; Liu et al. 2010; Fowler et al. 2013; Geisseler and Scow, 2014; Marco, 2014; Zhang et al. 2015; Breuillin-Sessoms et al. 2017). El daño se agudiza cuando se analiza la eficiencia de uso de los fertilizantes, es decir, no todo el fertilizante agregado al suelo es absorbido por los cultivos. La eficiencia de uso de los fertilizantes es variable, pero se reportan valores cercanos al 50%. De acuerdo con el metaanálisis reportado por Liu et al. (2010), sólo el 55% de los 148.14 Tg de nitrógeno estimados saliente del sistema (Figura 1) formó parte del cultivo cosechado y sus residuos, el 15% perdido por erosión del suelo, 16% en lixiviación (filtración de NO_3^-) y el 14% se perdió en forma de gases nitrogenados (N_2O , NO , N_2). Por otro lado, Ladha et al. (2005) reportaron la eficiencia de uso de entre 30% y 50%, mientras el nitrógeno remanente en el suelo sólo le es útil en menos del 7% a cultivos posteriores. El resto termina alterando el ambiente.

Aunque el incremento en la eficiencia de uso de los fertilizantes es el camino promisorio, lograrlo es complicado debido a la heterogeneidad y complejidad del suelo, y a la diversidad en

la que los cultivos toman nitrógeno del suelo ya que diferentes cultivos requieren diferente cantidad de nitrógeno y tienen diferentes tasas de asimilación (Hofstra and Bouwman, 2005). Una de las maneras de incrementar la eficiencia en el uso de fertilizantes es la adición de EENF (por sus siglas en inglés, *Enhanced Efficiency of Nitrogen Fertilizer*). Se ha reportado un incremento del 5% en la productividad y 8% en la eficiencia del fertilizante en campos de arroz empleando EENF (la eficiencia es mayor en suelo alcalino) (Linguist et al. 2013), mientras Alonso-Ayuso et al. (2016) reportaron incremento en la eficiencia del fertilizante sin afectar la productividad en cultivos de maíz.

Los EENF actúan ya sea i) inhibiendo la actividad de la enzima ureasa, enzima que cataliza la conversión de urea a CO_2 y NH_3 , ii) inhibiendo el proceso de la nitrificación (oxidación de amonio a nitrato mediante nitrificadores), ó iii) mediante la liberación prolongada del fertilizante mediante la formulación de súper-agregados, que evita la volatilización de NH_3 . Además del incremento en la eficiencia de uso de los fertilizantes, algunos EENF ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$ y CaC_2) reducen la emisión tanto de metano (CH_4) como de óxido nitroso (N_2O) en sistemas de cultivo de arroz (Linguist et al. 2013). Ya que los cereales más importantes como maíz, trigo y arroz son la base de la alimentación humana global, mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno es un reto mayor para lograr una agricultura y uso de suelo sostenibles.

2.2. La nitrificación y la agricultura

El suelo es el ecosistema más complejo y heterogéneo sobre el planeta, presenta variaciones importantes en su geoquímica, textura y contenido en nutrientes. Es en el suelo en donde se llevan a cabo la mayoría de las reacciones biogeoquímicas, y relaciona la diversidad y abundancia de microorganismos en toda la biósfera mediante la formación de micro-agregados y/o ecosistemas enteros (Marco, 2014; Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015). Debido a su

complejidad, la mayoría de los microorganismos aún son desconocidos. Se estima que sólo cerca del 1% de los microorganismos en el suelo pueden ser cultivados, y diferenciar entre los estados fisiológicos en los que se encuentran es aún más complejo (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2013), pudiendo incluso coexistir diferentes procesos metabólicos en un área específica (microambientes) (Kuzyakov and Blagodatskaya, 2015).

Es debido a estas características que los microorganismos del suelo responden a diferentes factores, ya sean i) intrínsecos, como edáficas, ii) relacionados con su actividad metabólica (producción de metabolitos, relación simbiótica con plantas y sus exudados, sinergismo y antagonismo, etc.), iii) o debido a factores ambientales (temperatura, altitud, concentración de oxígeno, disponibilidad de sustratos, etc.), y iv) antropogénicos (contaminación ambiental, fertilización, cambios de uso de suelo, desarrollo tecnológico, agricultura, etc.).

En el suelo se llevan a cabo las reacciones que rigen el ciclo del nitrógeno, y entender cómo los factores ambientales y antropogénicos pueden regir los procesos metabólicos en él es de elevada importancia. Durante este ciclo, las formas reducidas son oxidadas hasta la forma más estable: NO_3^- , a partir del cual el elemento regresa a su reservorio ambiental: N_2 . Mientras las formas reducidas (NH_4^+ , NH_3 , R-NH_2) sirven de fuente de energía para quimiolitioautótrofos (grupos microbianos del dominio Archaea y Bacteria) durante la fijación de CO_2 , las formas oxidadas (NO_3^-) sirven como fuente primaria del elemento en plantas superiores, y como el aceptor de electrones en el proceso de oxidación de materia orgánica para los microorganismos bacterianos anaeróbicos facultativos (reducción de nitrato a amonio: DNRA/ANRA; por sus siglas en inglés: *dissimilatory/assimilatory nitrogen reduction*).

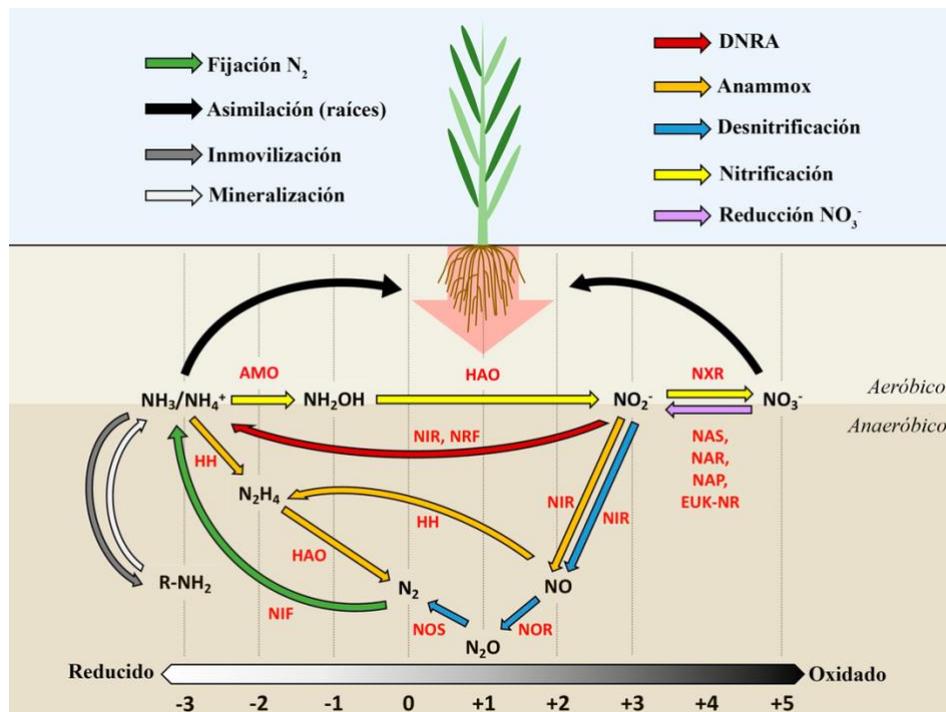


Figura 2. Diagrama esquemático del ciclo del nitrógeno en la biósfera (modificado de [Coskun et al. \(2017\)](#)).

Son los microorganismos quienes rigen los procesos que completan el ciclo biogeoquímico con reacciones de fijación biológica, amonificación, nitrificación y desnitrificación, reducción asimilatoria/disimilatoria de nitrato a amonio y oxidación anaerobia de amonio (*anammox*, por sus siglas en inglés: *anaerobic ammonia oxidation*) (Figura 2). La nitrificación es el proceso oxidativo de la conversión de amoníaco a nitrato, mediado por cuatro grupos de microorganismos quimiolitotrofos: i) bacterias oxidadoras de amonio (AOB: *ammonia-oxidizing* bacteria), ii) arqueas oxidadoras de amonio (AOA: *ammonia-oxidizing* Archaea), iii) bacterias oxidadoras de nitritos (NOB: *nitrite-oxidizing* bacteria), iv) y comammox (*complete ammonia oxidizers*) quienes, en su genoma, pueden codificar los genes para todas las enzimas involucradas en el proceso; hecho identificado recientemente por [Daims et al. \(2015\)](#) y [Nunes-Alves \(2016\)](#).

La limitante principal en el estudio de los microorganismos relacionados a este proceso incluye tener tasa de crecimiento baja, fases lag poco predecibles y sensibilidad a factores

ambientales y edáficos (Sinigalliano et al. 1995; Junier et al. 2009, 2010; Guo et al. 2013), es por ello por lo que se suelen emplear técnicas independientes del cultivo para su estudio, donde el empleo de marcadores moleculares ha sido el más común. Para esto, se emplean iniciadores afines a los genes que codifican las enzimas involucradas en un proceso metabólico específico durante el ciclo; en la nitrificación se suelen emplear como marcadores: *amoA* [BC] (Sinigalliano et al. 1995; Junier et al. 2009), *hao* (Bergmann et al. 2005) y *nxrB* [A] (Pester et al. 2014; Breuillin-Sessoms et al. 2017) (Figura 2).

Ha sido mediante el uso de éstos que los microorganismos oxidadores de amoníaco han sido agrupados en las clases Beta- y Gammaproteobacteria. En el primer grupo se encuentran los géneros *Nitrosomonas* (incluye a *Nitrosococcus mobilis*) y *Nitrospira* (incluye *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*), mientras que en el segundo grupo están los géneros *Nitrosococcus* y *Nitrobacter* (especies: *oceanii* y *halophilus*) (Junier et al. 2009, 2010; Guo et al. 2013). Lo anterior con base en la similitud del gen 16S rDNA. Los AOA son miembros los filos Thaumarchaeota y Cranarchaeota (Hatzenpichler, 2012), y se han aislado a *Nitrosopumilus maritimus* SMC1 (Könneke et al. 2005; Walker et al. 2010) y *Candidatus Nitrosocaldus yellowstonnii* (de la Torre et al. 2008). Además de *Nitrospira* spp. dentro de los “commamox”. La nitrificación controla la biodisponibilidad de las formas asimilables de nitrógeno en suelo para las plantas (NH_3 y NO_3^-), y es la ruta de pérdida de nitrógeno por lixiviación (filtración de NO_3^-) o por desnitrificación (reducción de NO_3^- a N_2) (Ollivier et al. 2011; Guo et al. 2013; Breuillin-Sessoms et al. 2017).

Es por el cambio de uso de suelos y su uso no sostenible, producto del crecimiento y demanda alimentaria poblacionales y al crecimiento y desarrollo de la agricultura, que se ha propuesto como alternativa sostenible la Agricultura de Conservación (AC). La AC se basa en tres principios básicos: i) la rotación de cultivos, ii) mínima perturbación del suelo y iii) el manejo (retención) de residuos agrícolas. De manera general, la AC mejora los procesos del

suelo aumentando la materia orgánica del mismo, controla la erosión, reduce los costos y aumenta la productividad de los cultivos (Govaerts et al. 2009; Dendooven et al. 2012), además de mitigar la emisión de gases de efecto invernadero comparado con las prácticas convencionales de cultivo (CT) (Dendooven et al. 2012).

Se sabe que el uso de suelo afecta grupos microbianos involucrados en los procesos biogeoquímicos. Se han reportado el efecto de la fertilización, uso de suelo, labranza, y retención de residuos agrícolas sobre comunidades microbianas en el suelo. Tras evaluar el efecto del manejo de residuos agrícolas, la fertilización inorgánica y labranza sobre los microorganismos del suelo, Chávez-Romero et al. (2016) concluyeron que la labranza y el manejo de residuos agrícolas en suelos para cultivo determinaron la estructura microbiana en el mismo, siendo la fertilización quien definió el incremento en la abundancia relativa de *Nitrosovibrio* (Nitrosomonadaceae, Nitrosomonadales); aunque fue el contenido de C orgánico quien afectó un alto número de grupos bacterianos. Esto último relacionado con la incorporación de residuos, factor que incrementa la materia orgánica. Por otro lado, Jiménez-Bueno et al. (2016) observaron diferencias significativas en la estructura microbiana contrastando suelos fertilizados contra suelos no fertilizados (0 kg N ha⁻¹ contra 300 kg N ha⁻¹); ciertos grupos taxonómicos fueron definidos por el uso de suelo, y que el manejo de residuos, el contenido de carbono y el pH fueron los factores que explicaron la variación en la composición bacteriana.

La retención de residuos agrícolas, una de las bases de la agricultura de conservación, incrementa el contenido de materia orgánica del suelo, lo que podría explicar el incremento en grupos que proliferan en ecosistemas ricos en material orgánico: copiotrofos (Marco, 2014); entre las clases Alfa- y Gammaproteobacteria, y los filos Bacteroidetes y Actinobacteria (Ramirez-Villanueva et al. 2015). Uno de los factores importantes para tener en cuenta en dinámicas poblacionales es el pH del suelo; éste se ha visto modificado seriamente por la fertilización inorgánica a largo plazo, producto de la acumulación de los metabolitos del proceso

de la nitrificación (NO_2^- y NO_3^-). De acuerdo con [Zhalnina et al. \(2015\)](#), el suelo se acidifica por la fertilización con sulfato de amonio provocando diferentes respuestas, incluyendo correlación negativa de la fertilización con microorganismos que prefieren alto contenido en nutrientes (copiotros), como los filos Verrucomicrobia y Chloroflexi ([Ramirez-Villanueva et al. 2015](#); [Zhalnina et al. 2015](#)), y una correlación positiva con los filos Thaumarchaeota y Nitrospirae, junto a cuatro géneros: *Geobacter*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Nitrospira* y *Methylibium*; varios de ellos relacionados directamente con el ciclo del nitrógeno ([Guo et al. 2013](#); [Banning et al. 2015](#); [Zhalnina et al. 2015](#)). Lo anterior con base en el estudio de suelos fertilizados desde 1853 en Rothamsted (<http://www.era.rothamsted.ac.uk/Park>) ([Zhalnina et al. 2015](#)).

Si bien se tienen varios reportes de los factores que definen la estructura de la microbiota del suelo y que afectan los ciclos geo-bioquímicos, aún falta mucho por dilucidar. De acuerdo con la revisión histórica de [Monteiro et al. \(2014\)](#), le ha tomado al hombre más de dos siglos averiguar lo que se sabe actualmente del ciclo del nitrógeno. Tal hecho permite pensar en lo que aún se desconoce. Además, con el uso de herramientas de secuenciación masiva y técnicas libres de cultivo para la identificación de microorganismos, la resolución puede mejorar lo resuelto en estudios previos.

III. Justificación

El nitrógeno es uno de los elementos vitales en el ecosistema; su uso excesivo como fertilizante en la agricultura mundial pone en peligro la característica sostenible y sustentable del suelo a largo plazo. El conocimiento que tenemos acerca de la interacción entre los microorganismos en el suelo aún es limitado; entender cuál es la estructura y función, además de cómo éstos responden ante los cambios en el ambiente nos pone en ventaja para saber cómo responder ante la crisis alimentaria y ambiental actuales. El aumento en el uso de fertilizantes en los cultivos agrícolas a nivel global es producto del crecimiento y demanda alimentaria poblacionales, que trae consigo un serio problema ambiental; desde el incremento en el contenido de nitratos en los cuerpos de agua (eutroficación), incremento de gases nitrogenados en el aire, hasta daños a la capa de ozono. Tales procesos contribuyen al deterioro del ecosistema y repercute en la salud humana.

Ampliar nuestro conocimiento sobre los microorganismos responsables y relacionados con el metabolismo del nitrógeno es necesario para concientizar su uso y desarrollar metodologías para su uso eficiente; disminuyendo y/o lentificando el daño ambiental antropogénico. Ya que un gran número de microorganismos relacionados con el ciclo aún no pueden ser cultivados, el uso de tecnologías independientes de cultivo, como el análisis metagenómico y secuenciación masiva, nos permitirán descifrar su estructura, diversidad y funciones.

IV. Hipótesis

La estructura microbiana del suelo (metagenoma) se verá definida por la dinámica de nutrientes y al uso de fertilizantes inorgánicos, uso de residuos agrícolas y por el manejo de suelo.

V. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de prácticas agrícolas convencional y de conservación, y el uso de fertilizantes nitrogenados sobre los microorganismos nitrificantes del suelo.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la adición de residuos de maíz en el metagenoma de un suelo sujeto a agricultura de conservación y fertilización a largo plazo.
2. Determinar la estructura, diversidad y abundancia del microbioma en suelos con práctica agrícola convencional y de conservación sin fertilización a largo plazo, y el efecto de adición de N (adición de $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$) a través de una dinámica aeróbica de 56 días.
3. Determinar la estructura, diversidad y abundancia del microbioma en suelos con práctica agrícola convencional y de conservación con fertilización a largo plazo ($300 \text{ kg urea-N ha}^{-1}$), y el efecto de adición de N (adición de $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$), a través de una dinámica aeróbica de 56 días.

VI. Capítulo I: Efecto de la adición de residuos de plantas de maíz sobre el metagenoma de un suelo con manejo de agricultura de conservación.

6.1. Introducción

Los residuos orgánicos en el suelo son de suma importancia por ser el sustrato para los microorganismos, y proveer nutrientes a las plantas y cultivos tras su mineralización (Lal, 2014). Un mayor contenido de material orgánico mejora la estructura del suelo, que facilita la infiltración de agua, el flujo de los gases, y prevé la erosión. A su vez, la oxigenación del suelo reduce los procesos anaerobios como la metagenogénesis y la desnitrificación; procesos que contribuyen en la emisión de gases de efecto invernadero, por ejemplo, metano y óxido nitroso (Keiluweit et al. 2017).

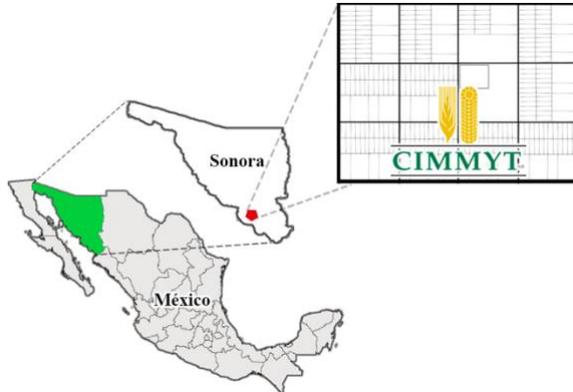
La materia orgánica en el suelo es oxidada por los microorganismos, y provee de elementos nutritivos esenciales a las plantas, por ejemplo, nitrógeno (N). La mineralización del material orgánico, la liberación de nutrientes, y el cómo afecta las poblaciones microbianas han sido bien estudiadas (Herbert, 1999; Okoh and Edu, 2019; Wei et al. 2020). Sin embargo, el efecto de la adición de material orgánico sobre las poblaciones, su estructura y funcionalidad permanece aún sin resolver. Dado que el material orgánico y su dinámica es importante en la agricultura, el “centro internacional para el mejoramiento de maíz y trigo” (por sus siglas en inglés, CIMMYT) inició el campo de larga experimentación conocido como “Centro Norman E. Borlaug” (CENEB), cuyo objetivo es investigar el efecto del manejo y retención de residuos, rotación de cultivos, y manejo de suelo (prácticas agrícolas convencionales y de conservación) sobre la productividad de las cosechas.

El campo experimental inició en 1992 en Ciudad Obregón (Sonora, México), en donde se combinó el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum durum* L.) en i) camas convencionales con incorporación de cultivos, ii) camas permanentes con quema de residuos ó ii) camas permanentes con retención de cultivos ([Verhulst et al. 2011](#); [Limon-Ortega et al. 2006-2007](#)). El campo experimental permite estudiar el efecto de las prácticas y manejo agrícola sobre la productividad en cultivos, y sobre la población microbiana del suelo ([Chávez-Romero et al. 2016](#); [Jiménez-Bueno et al. 2016](#)). Investigaciones basadas en el uso de marcadores moleculares han demostrado los cambios en la estructura microbiana del suelo producto de la adición de diferentes tipos de material orgánico; así como su correlación con variables edáficas y ambientales, y características del material orgánico ([Zhao et al. 2014](#); [Chávez-Romero et al. 2016](#); [Maron et al. 2018](#)).

La metagenómica, es decir, la secuenciación masiva, directa y aleatoria del DNA total de una muestra ambiental, permite identificar la diversidad y composición taxonómica y funcional de muestras ambientales. Ésta se ha usado para evaluar las poblaciones microbianas en diferentes ecosistemas como el suelo ([Luo et al. 2014](#); [Souza et al. 2015](#); [Guo et al. 2018](#); [Nelkner et al. 2019](#)). El estudio del suelo con metagenómica ha permitido la identificación de diferentes grupos bacterianos con potencial promotor de crecimiento vegetal y benéficos para la salud de las plantas, y al mismo tiempo, ha permitido observar el limitado efecto que diferentes prácticas agrícolas sobre las poblaciones microbianas ([Nelkner et al. 2019](#)). Sin embargo, los cambios en éstas y su diversidad taxonómica y funcional, debido a la adición de residuos de cultivos aplicados a suelos con manejo y prácticas de conservación, permanece aún con incertidumbre. Por el ello, el presente estudio se dirigió a responder las siguientes interrogantes: i) el efecto de la adición al suelo de residuos de plántulas de maíz sobre la comunidad y estructura microbianas en un suelo de cultivos, ii) la alteración en la funcionalidad

potencial de la población microbiana, y iii) el efecto de la adición de los residuos en la diversidad funcional y taxonómica del suelo.

a)



b)

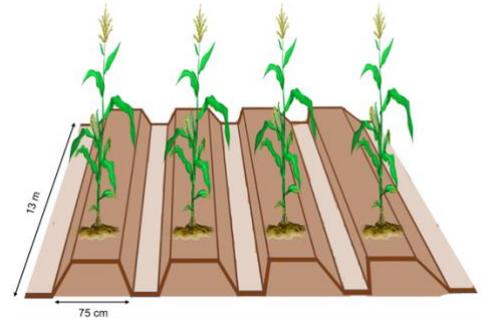


Figura 3. Diagrama de a) la localización del campo experimental Centro Norma E. Borlaug (CENEB, Cd. Obregón, Sonora), y b) esquema de camas permanentes en el campo experimental

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Sitio experimental

El sitio experimental Norman E. Borlaug (CENEB) se localiza cerca de ciudad Obregón, Sonora, México (Figura 3a). El área es árida con precipitación pluvial promedio de 384 mm y temperatura promedio de 24 °C (Verhulst et al. 2011). El diseño experimental en campo es por bloques aleatorizados, y cada tratamiento cuenta con tres réplicas de campo (de ahora en adelante “parcelas”) con un área ~100 m². Los diferentes tratamientos incluyen el manejo de fertilizantes inorgánicos, manejo de suelo y de residuos agrícolas y la interacción de éstos, además de rotación de cultivos: trigo en invierno, y maíz en verano. En el presente estudio se empleó el tratamiento agrícola de camas permanentes, retención de residuos de cultivos (maíz y trigo) y fertilización con urea (300 kg urea-N ha⁻¹). Cada cama con 0.75 m x 13 m, y 6 camas

por réplica de campo. Cada réplica de campo cuenta con 8 camas (Figura 3b). Los detalles del campo experimental se describen en [Verhulst et al. \(2011\)](#), [Limón-Ortega et al. \(2000, 2006\)](#).

6.2.2. Muestreo y caracterización del suelo

Se tomaron y formaron muestras compuestas a partir de la mezcla de 20 puntos de muestreo por parcela. De los 0-15 cm de la capa superior, e ignorando las camas internas de las parcelas (dos camas centrales). Lo detalles del muestreo pueden leerse en [Jiménez-Bueno et al. \(2016\)](#). Las muestras compuestas de suelo de cada parcela se mantuvieron separadas, durante todo el experimento. A cada muestra de suelo se les determinó el contenido de humedad, C y N totales, conductividad electrolítica (EC), pH y textura, de acuerdo con lo descrito en [Verhulst et al. \(2011\)](#). La capacidad de retención de agua (WHC) fue determinado tras saturar 20 g de suelo, y dejar drenar 12 h. La cantidad de agua retenida es su WHC.

6.2.3. Cultivo de plantas de maíz y experimento en microcosmos

Los detalles del cómo las plantas de maíz fueron cultivadas puede leerse en [Ramírez-Villanueva et al. \(2015\)](#). De manera breve, las semillas de maíz fueron esterilizadas de la superficie, y germinadas en agar al 0.8%. Los brotes fueron trasplantados a vermiculita enmendada con soluciones Steiner (1961), en una cámara de crecimiento. Las plantas fueron cultivadas durante 25 días. Su caracterización, realizados sobre plantas maceradas (< 1 mm) y secas, reveló que su composición fue: C total de 422 g kg⁻¹, N total de 34 g kg⁻¹, contenido de lignina de 25 g kg⁻¹, (hemi)cellulosa de 311 g kg⁻¹, polifenoles de 2 g kg⁻¹, cenizas de 62 g kg⁻¹. El contenido restante durante la caracterización fue considerado la fibra de detergente soluble.

Un total de 300 g de muestra de suelo de cada parcela ($n = 3$), con pH de 8.6, EC 0.79 dS m⁻¹, N total de 0.60 g k⁻¹ suelo, C orgánico de 13.3 g kg⁻¹ de suelo, textura (g kg⁻¹ de suelo): 10 g arcilla, 270 g de arena, y 720 g limo), fue ajustado al 40% de su WHC con dH₂O. Las muestras fueron incubadas durante 7 días (pre-incubación) en recipientes de plástico de 50 l que además contenían 1 l de solución de NaOH (1M) para atrapar el anhídrido carbónico liberado (CO₂). Después de la pre-incubación, las muestras fueron extraídas del recipiente. Dos submuestras de 50 g de suelo (de cada parcela, $n = 3$) fueron dispuestas en frascos de 200 ml. A una submuestra de suelo de cada parcela se le adicionó lo equivalente a 2 g C kg⁻¹ en forma de residuos de plantas de maíz ($n = 3$), y homogeneizado, mientras que las restantes ($n = 3$) se dejó intacta (sin adición de residuos ó muestra control) y homogeneizada. Los frascos de 200 ml con suelo fueron dispuestos en frascos de 1 l, un frasco pequeño con de dH₂O para evitar desecación, y otro con 20 ml de NaOH (1M) para atrapar el CO₂ (Figura 4). Tras tres días de incubación, los frascos de 1 l fueron abiertos, y el suelo fue removido. El suelo se empleó para extraer el DNA total. La elección de analizar las muestras tras tres días de experimento fue con base en los resultados de un experimento anterior; éste mostró que la mineralización del residuo de maíz y el efecto sobre la comunidad microbiana del suelo fue elevado tras tres días ([Chávez-Romero et al. 2016](#)).

6.2.4. Extracción y secuenciamiento directo del DNA

El DNA total de las muestras de suelo ($n = 6$) se basó en tres métodos de lisis microbiana con el uso de cambios de temperatura, disrupción mecánica y química ([Hoffman and Winston, 1987](#); [Sambrook and Russell, 2001](#); [Valenzuela-Encinas et al. 2008](#)). Un total de 10 g de suelo por parcela y tratamiento fue empleado para la extracción total de DNA con cada método. Es decir, 30 g de suelo fueron empleados para la extracción de DNA para cada réplica de

tratamiento. El DNA de cada parcela, de los tres métodos, y de cada tratamiento fue mezclado, obteniendo así 6 muestras de DNA metagenómico. La integridad del DNA se evaluó en geles de agarosa (0.8%), y cuantificados empleando el ensayo fluorométrico con PicroGreen® en el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Scientific, Carlsbad, CA). La secuenciación se llevó a cabo con la plataforma Illumina® HiSeq200 2x100 *paired-end*. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del NCBI (SRA) con el número PRJNA534094.

6.2.5. Análisis bioinformático: ensamble y anotación funcional

El análisis bioinformático incluyó los siguientes procesos (Figura 5): i) filtrado de secuencias humanas, ii) filtrado de calidad, iii) ensamble de secuencias, d) predicción funcional (marcos abiertos de lectura, ORFs), iv) anotación funcional. En resumen, las secuencias fueron alineadas contra el genoma humano de referencia GRCh37/hg19 mediante BMAP (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Las lecturas que mostraron identidad mayor al 99% contra hg19 fueron descartadas. La herramienta Sickle (Joshi and Fass, 2011) se empleó para eliminar secuencias con baja calidad: valor *Phred* < 20, y, < 50 bases (pb). Las secuencias pareadas (*paired-end*) y sin par (*unpaired reads*) obtenidas tras el filtro de calidad fueron empleadas para su posterior ensamble con el software MEGAHIT (Li et al. 2015). Los *contigs* obtenidos tras el ensamble con MEGAHIT fueron anotados funcionalmente tras su alineamiento contra la base de datos no redundante de proteínas del NCBI (*non-redundant database*: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz>) mediante la herramienta BLAST (Altschul et al. 1990) y DIAMOND (Buchfink et al. 2015). Los resultados del alineamiento fueron analizados con el software MEGAN CE (Huson et al. 2016). Los genes fueron anotados de acuerdo con las bases de datos de SEED y COGs (Powell et al. 2012; Overbeek et al. 2014). Por otro lado, se evaluaron los genes involucrados en el proceso de oxidación-reducción del nitrógeno

mediante el alineamiento de los *contigs* contra la base de datos NCyc al 95% de homología mediante el uso del alineador DIAMOND (Buchfink et al. 2015).

La base de datos NCyc contiene familias de genes involucrados en el ciclo del nitrógeno, y se creó con base en UniProt, COG, SEED, KEGG y eggNOG (Tu et al. 2019).

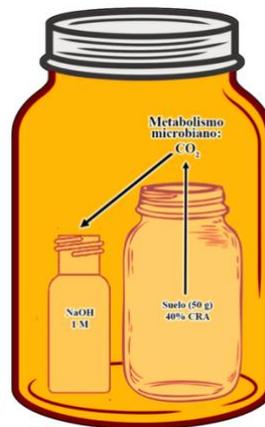


Figura 4. Diseño de la unidad experimental.

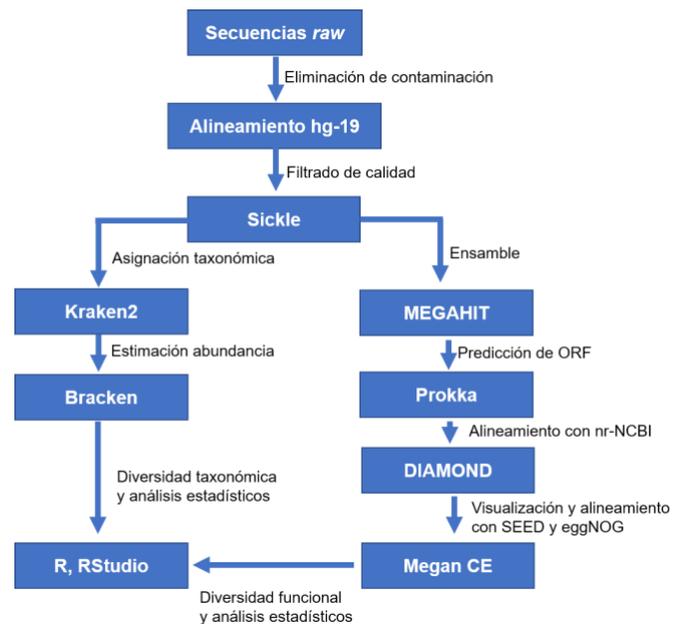


Figura 5. Flujo de análisis bioinformático del metagenoma.

Cuadro 1. Número de secuencias asignadas taxonómicamente empleando Kraken2 y Bracken.

SRA ¹	Tratamiento ²	Bacteria	Archaea	Hongos	Protistas	Virus
SRX5767015	UNS	4,129,576 ^{3,4}	209,076 ⁴	61,531 ⁴	56,450 ⁴	42,703 ⁴
SRX5767016	UNS	9,565,580	251,923	77,838	69,860	52,509
SRX5767013	MAS	12,995,257	252,538	99,682	80,273	57,390
SRX5767014	MAS	13,091,904	259,629	101,081	83,873	58,499

¹ Número de acceso en NCBI-SRA; ² Tratamiento: suelo sin adición de residuos de maíz (UNS), y con adición de residuos de plantas de maíz (MAS); ³ Número total de secuencias asignadas con base en la tabla de OTUs tras su análisis con Kraken2+Bracken; ⁴ Número mínimo de lecturas para rarificación.

6.2.6. *Análisis de la estructura microbiana del suelo.*

Las secuencias obtenidas tras el filtrado de calidad fueron evaluadas con la herramienta Kraken2 (Wood et al. 2019) para la determinación taxonómica de las comunidades microbianas. Las secuencias fueron alineadas contra las bases de datos construida a partir de los genomas completos en RefSeq de los tres dominios: *Bacteria*, *Archaea*, y *Eukarya* (Hongos y Protistas), y de Virus. Los resultados obtenidos de Kraken2 fueron re-analizados con la herramienta Bracken (Lu et al. 2017). Los resultados taxonómicos obtenidos fueron convertidos a una tabla de OTUs (tabla de unidades taxonómicas operativas, OTU-table) para los análisis posteriores.

6.2.7. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico fue hecho en el ambiente R v3.6.4 (R Core Team, 2019). Una de las características de los datos de secuenciación masiva es su naturaleza “composicional”, es decir, la abundancia de un grupo es inherente a la abundancia de otro grupo; esto debido a la plataforma de secuenciación y a su capacidad (Quinn et al. 2019). Por ello, se empleó el paquete ALDEx2 para la transformación de los datos, y posteriormente, evaluar el efecto del tratamiento

sobre la estructura bacteriana. Los mapas de calor (*heatmaps*) se construyeron a partir de los grupos bacterianos con abundancia relativa dominante, y los PCA a partir de los datos transformados empleando el método clr (siglas en inglés: *centered-log-ratio*) (Fernandes et al. 2014; Gloor et al. 2017; Gloor et al. 2019). Las diferencias en la abundancia de grupos/genes entre tratamientos fueron determinadas empleando DESeq2 (Love et al. 2014). Además, los cambios en la abundancia relativa fueron evaluados mediante un “factor de cambio” (*ratio*) y calculados de acuerdo con:

$$ratio = (\text{suelo enmendado con residuos de maíz } RA - \text{suelo control } RA) / \text{suelo control } RA,$$

donde, RA: abundancia relativa promedio.

La diversidad y riqueza taxonómica fueron determinadas empleando la tabla de OTUs rarificada al mínimo número de lecturas asignadas para cada base de datos empleada (Cuadro 1). La diversidad taxonómica y funcional fueron determinados empleando los números de Hill a diferentes órdenes de q ($q = 0, 1$ y 2). Los números de Hill fueron empleados porque circundan los sesgos debido a los grupos taxonómicos/genes con alta y baja abundancia, además de estar definidos en unidades de “número de especies” y poder ser comparables con índices tradicionales (Ma and Li, 2018).

6.3. Resultados

6.3.1. Análisis del microbioma del suelo y ensamble del metagenoma

En número de lecturas asignadas con cada base de datos se obtuvo que Bacteria > Arqueas > Hongos > Protistas > Virus, en todas las muestras. El dominio Bacteria fue el más abundante con > 95% de las lecturas asignadas, seguido por el dominio *Archaea* (>2%), y en menor proporción hongos, protistas y virus (Figura 6).

Las curvas de rarefacción mostraron una tendencia asintótica, por lo que mayor profundidad de secuenciación sólo hubiese incrementado el número de grupos taxonómicos determinados de manera limitada, en todos los casos (Figura 7). Los resultados detallados de secuenciación y ensamblaje se presentan en el Cuadro 2. Debido a la baja calidad del DNA, una réplica por tratamiento fue descartada. En promedio, se determinaron 68,817 ORFs en el tratamiento sin residuos de maíz, y 117,757 ORFs en el tratamiento con residuos de maíz.

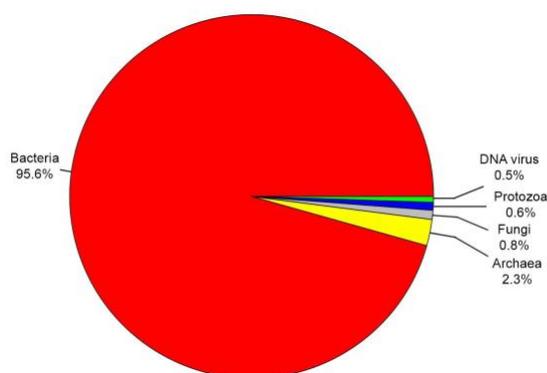


Figura 6. Distribución taxonómica del metagenoma del suelo.

Cuadro 2. Resumen del ensamblaje del metagenoma.

SRA ¹	Muestra ²	Secuencias totales	Tamaño (Gbp)	No. <i>contigs</i>	ORFs ³
SRX5767015	UNS	36,849,260	3.68	64,199	64,199
SRX5767016	UNS	43,739,900	4.37	73,438	73,438
SRX5767013	MAS	43,467,248	4.34	117,789	117,780
SRX5767014	MAS	45,533,825	4.55	117,734	117,734

¹ Número de acceso al NCBI-SRA; ² Muestra: suelo sin adición de residuos de maíz (UNS), and con adición de residuos de plántulas de maíz (MAS); ³ Número de ORFs (marcos abiertos de lectura, por sus siglas en inglés) obtenido con el software Prokka (Seemann, 2014).

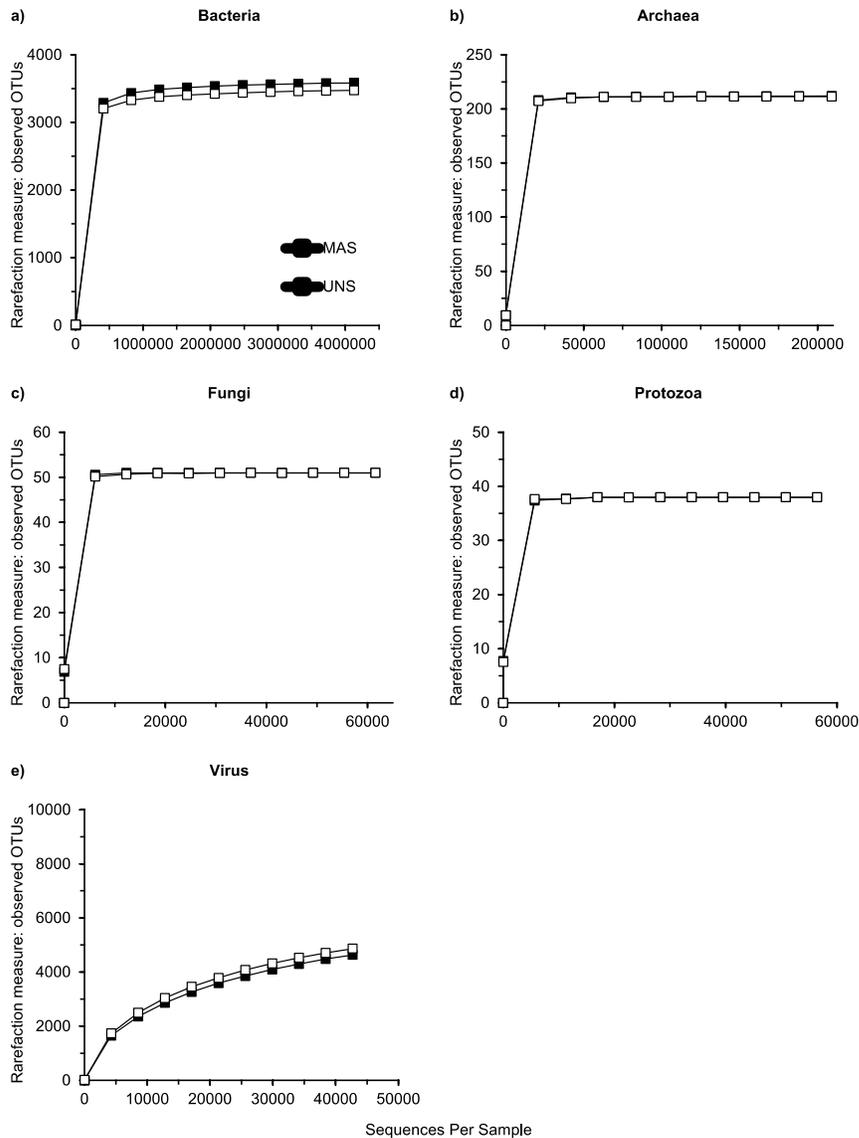


Figura 7. Curvas de rarefacción del número de OTUs de a) bacterias, b) arqueas, c) hongos, d) protistas, y e) virus.

6.3.2. Diversidad taxonómica

Los valores del índice de profundidad (“*good’s coverage index*”; Good, 1953) fue > 0.90 ; esto indica que se pudo haber recuperado la mayoría de los grupos microbianos presentes en el suelo. Los resultados del análisis de diversidad mostraron que los suelos con residuos de maíz presentaron mayor riqueza de especies ($q = 0$) bacterianas que el suelo sin residuos, sin embargo,

estuvieron dominados por un número reducido de especies, es decir, presentaron significativamente menor diversidad a valores de $q = 1$ ($p = 0.005$) y $q = 2$ ($p = 0.010$) (Figura 8a) comparado con el tratamiento sin residuos de maíz. La diversidad y riqueza de especies de arqueas, hongos y protistas fue similar entre tratamientos (Figura 8b-d).

La adición de residuos de maíz afectó negativa y significativamente la riqueza de virus en el suelo ($q = 0$, $p = 0.027$), sin dominancia de ningún grupo viral: diversidad similar entre tratamientos a valores de $q = 1$ y $q = 2$ (Figura 8e).

6.3.3. Estructura bacteriana del suelo

El suelo sin adición de residuos de maíz estuvo dominado por los filos Proteobacteria (abundancia relativa $60.09 \pm 5.39\%$), Actinobacteria ($27.94 \pm 3.22\%$) y Firmicutes ($2.31 \pm 0.03\%$), y el suelo con adición de residuos por Proteobacteria ($70.17 \pm 0.89\%$), Actinobacteria ($22.04 \pm 0.17\%$) y Bacteroidetes ($2.31 \pm 0.31\%$) (Figura 9). A nivel de género, *Streptomyces* ($5.88 \pm 0.04\%$), *Sphingomonas* ($3.07 \pm 0.07\%$) y *Lysobacter* ($2.90 \pm 0.25\%$) dominaron el suelo sin residuos, y *Streptomyces* ($6.99 \pm 0.14\%$), *Lysobacter* ($6.65 \pm 0.15\%$), y *Stenotrophomonas* ($4.41 \pm 0.17\%$) el suelo con adición de residuos (Figura 10a). El análisis de abundancia diferencial mediante DESeq2 mostró que además de Proteobacteria y Bacteroidetes, varios géneros bacterianos, entre ellos, *Flavisolibacter*, *Lysobacter* y *Xanthomonas*, fueron positiva y significativamente enriquecidos por la adición de residuos de plantas de maíz (Figura 11).

La adición de residuos de maíz incrementó la abundancia relativa de un grupo limitado de filos, y la de varios géneros. La abundancia relativa de *Lysobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Flavobacterium* and *Sinorhizobium* incrementó ≥ 2 -veces en el suelo con adición de residuos, y la abundancia de *Nitrospira*, *Gemmata* y *Conexibacter* disminuyó ≥ 2.5 -veces. El análisis de componentes principales (PCA) separó los tratamientos de manera clara

e independientemente del nivel taxonómico, indicando probables diferencias en la composición bacteriana entre los suelos con y sin adición de residuos de plantas de maíz. Los dos componentes principales explicaron $> 86\%$ de la variabilidad de los datos a nivel de filo (Figura 12), y del 94% a nivel de género (Figura 13).

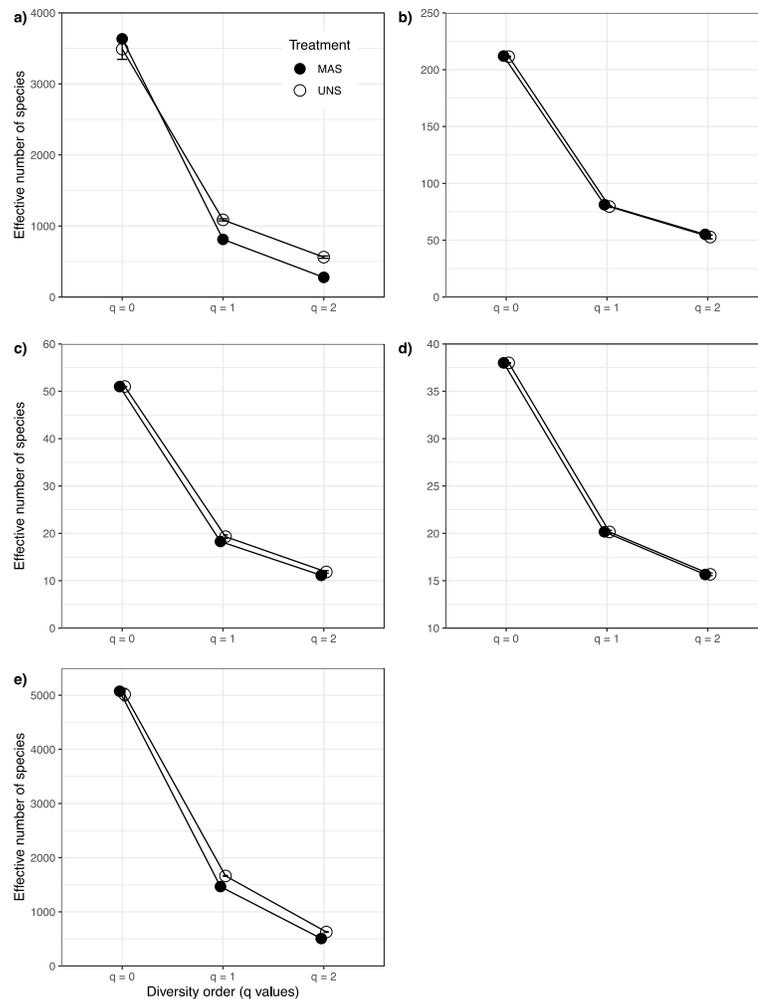


Figura 8. Diversidad taxonómica de a) Bacteria, b) Arquea, c) Hongos, d) Protistas, y e) Virus, mediante los números de Hill. UNS, suelo sin adición de residuos de maíz, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

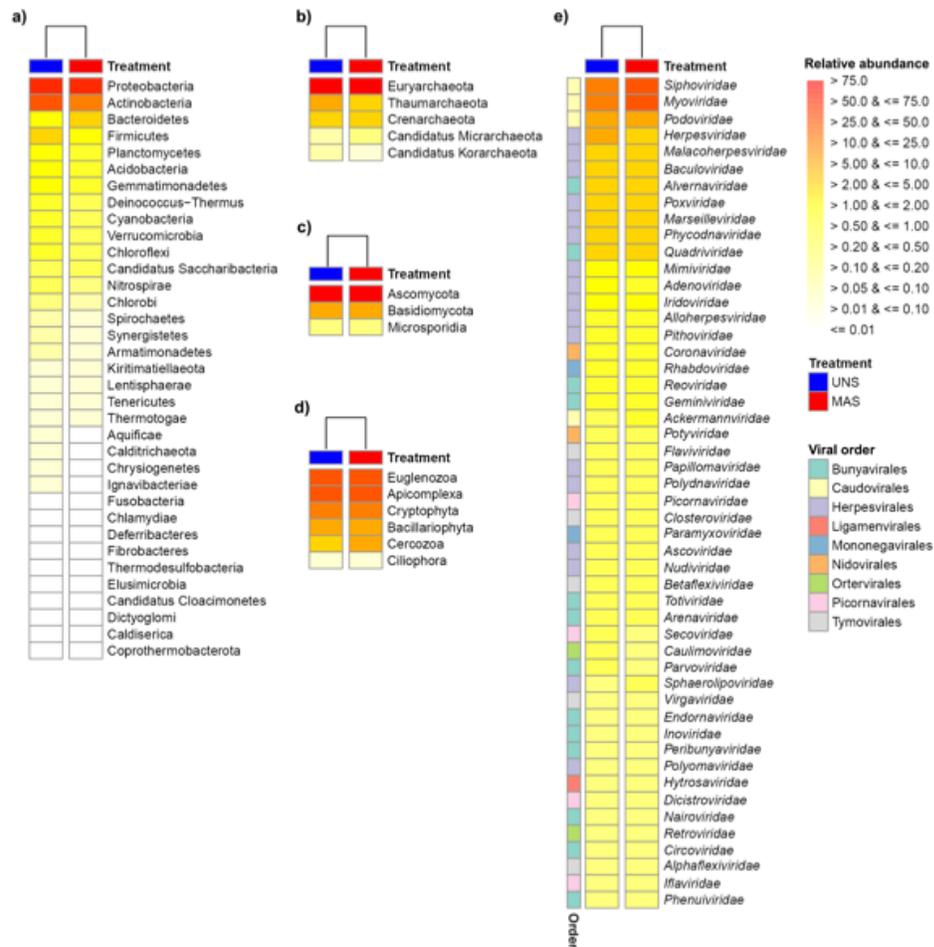


Figura 9. Heatmap con las abundancias relativas (%) al nivel taxonómico de filo de a) Bacteria, b) Arqueas, y c) Hongos, d) Protistas, y e) Virus (familias virales). UNS, suelo sin adición de residuos de maíz, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

6.3.4. Estructura del dominio Arquea en el suelo

El filo Euryarchaeota ($91.79 \pm 1.96\%$, abundancia relativa) fue el más abundante en el suelo sin adición de residuos de maíz, seguido por Thaumarchaeota (5.53 ± 1.97) (Figura 9). El filo Euryarchaeota también dominó el suelo con adición de residuos (94.51 ± 0.06), pero seguido del filo Crenarchaeota (2.91 ± 0.02). *Halobacterium* y *Halorubrum* fueron los géneros que dominaron ambos tratamientos (Figura 10b).

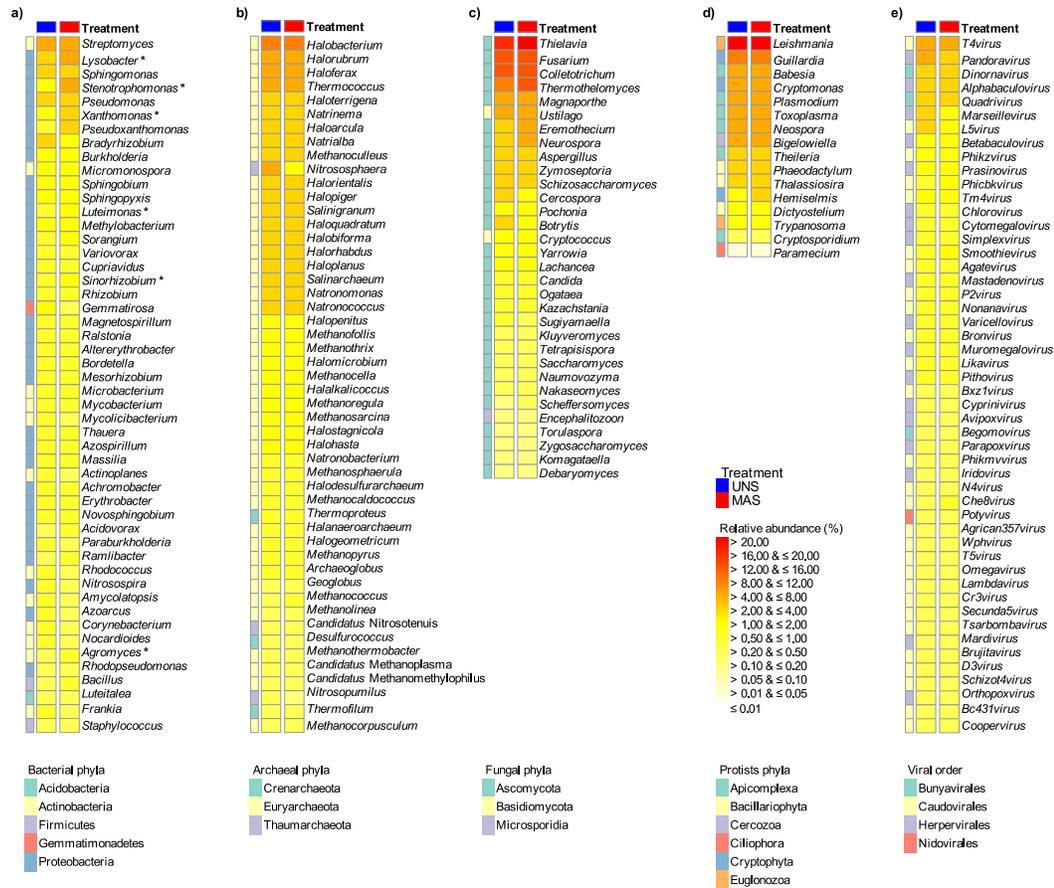


Figura 10. Heatmap con las abundancias relativas (%) al nivel taxonómico de género de a) Bacteria, b) Arqueas, c) Hongos, d) Protistas, y e) Virus. UNS, suelo sin adición de residuos de maíz, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

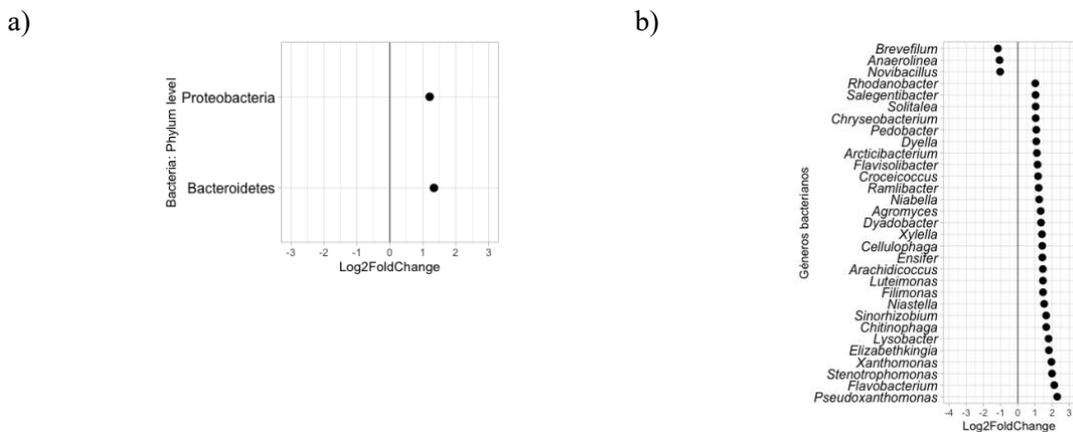


Figura 11. Análisis de abundancia diferencial con DESeq2 al nivel taxonómico de a) filo, y b) géneros bacterianos. Valores positivos de “Log2FoldChange” indican enriquecimiento de un grupo taxonómico en el suelo con adición de residuos de plantas de maíz respecto al control.

A nivel de filo, la aplicación de residuos de maíz afectó negativamente la abundancia relativa de miembros pertenecientes a Thaumarchaeota y positivamente a los de Crenarchaeota. La abundancia relativa de géneros como *Nitrososphaera* (Thaumarchaeota) disminuyó ≥ 2 veces en el suelo con adición de residuos, e incrementó la de *Desulfurococcus* (Crenarchaeota), entre otros. El análisis de componentes principales (PCA) separó claramente los tratamientos independientemente del nivel taxonómico, indicando diferenciación en la estructura de arqueas entre los tratamientos. Los dos componentes principales explicaron $> 90\%$ de la variabilidad de los datos a nivel de filo (Figura 12), y de $> 80\%$ a nivel de género (Figura 13).

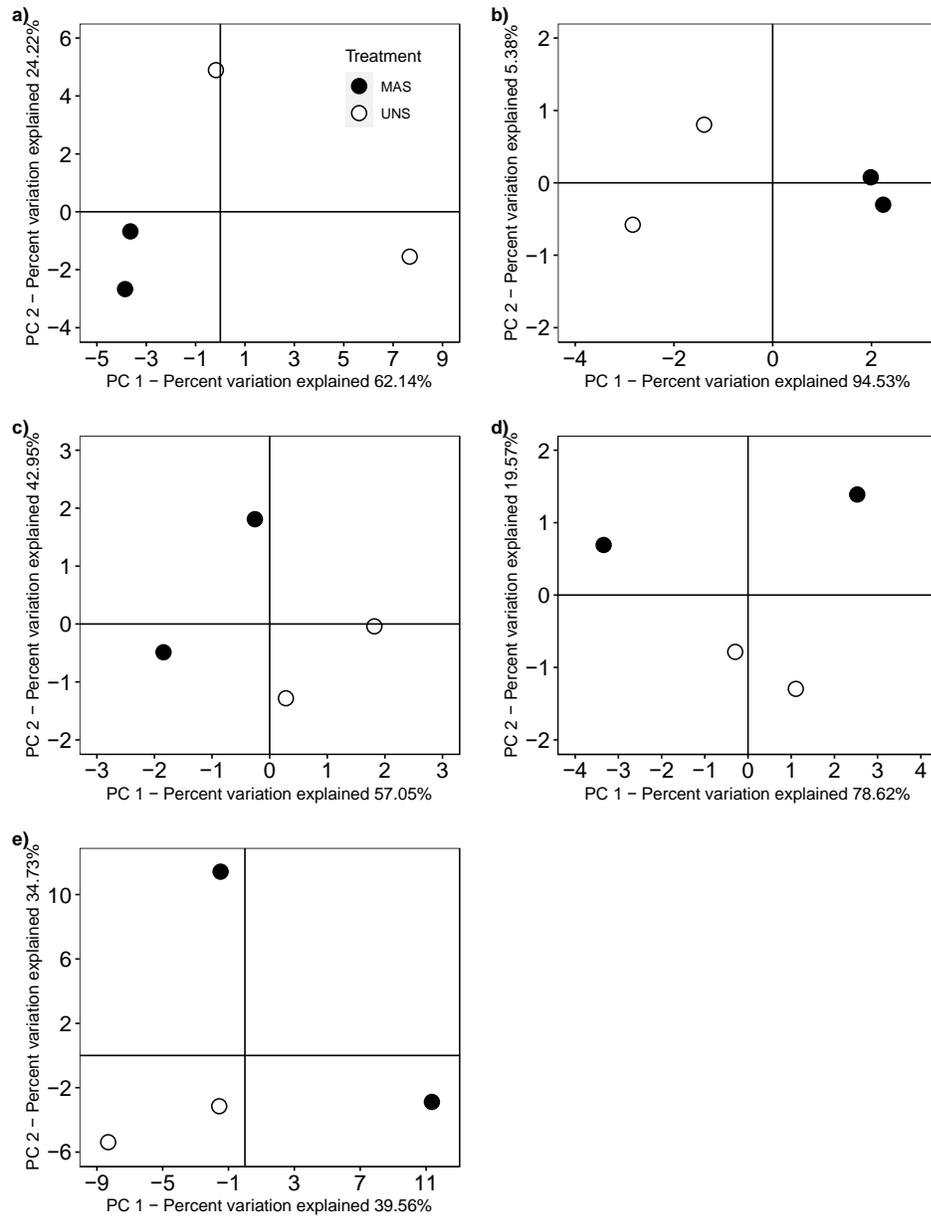


Figura 12. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos transformados de asignación taxonómica a nivel de filo para a) Bacteria, b) Arquea, c) Hongos, d) Protistas, e) Virus (familias). UNS, suelo sin adición de residuos de maíz, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

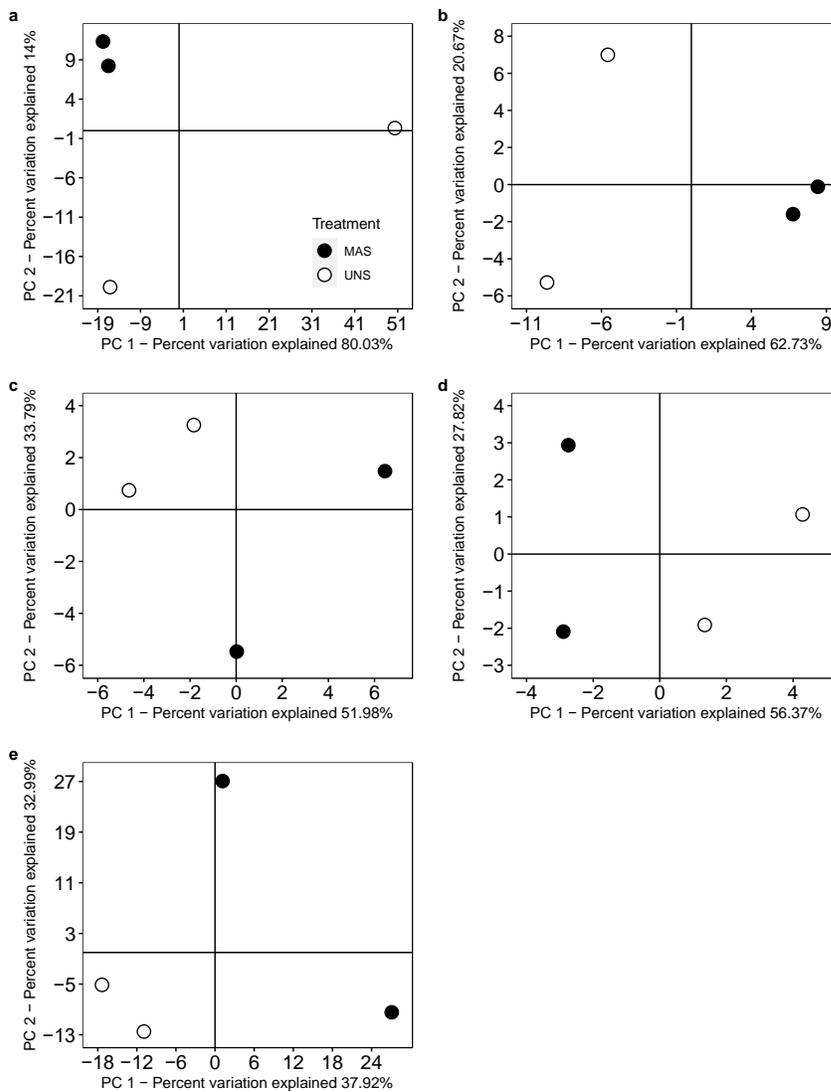


Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) de los datos transformados de los grupos microbianos a nivel de género para a) Bacteria, b) Arquea, c) Hongos, d) Protistas, y e) Virus. UNS, suelo sin adición de residuos de maíz, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

6.3.5. Comunidad de hongos del suelo

El suelo estuvo dominado por miembros pertenecientes al filo Ascomycota ($93.07 \pm 0.39\%$ en suelo sin adición de residuos, y $94.07 \pm 0.37\%$ en suelo con adición de residuos), seguido por Basidiomycota ($6.77 \pm 0.39\%$ en suelo sin residuos, y $5.76 \pm 0.34\%$ en el suelo con residuos) (Figura 9c), mientras *Thielavia* y *Fusarium* fueron los géneros más

abundantes (Figura 10c). La aplicación de residuos afectó negativamente la abundancia relativa de miembros de Basidiomycota, aunque su impacto a nivel de género fue menor comparado con los géneros bacterianos y de arqueas. El análisis de componentes principales (PCA) separó los tratamientos independientemente del nivel taxonómico. Esto podría indicar diferencias en la composición de hongos entre los tratamientos. Los dos componentes principales explicaron > 95% de la variabilidad de los datos a nivel de filo (Figura 12c), y de > 85% a nivel de género (Figura 13c).

6.3.6. Comunidad de protistas en el suelo

La estructura de protistas del suelo estuvo dominada por el filo Euglenozoa (abundancia relativa de $40.44 \pm 0.22\%$ en el suelo sin adición de residuos, y $39.10 \pm 0.40\%$ en el suelo con adición de residuos de plantas de maíz) y Apicomplexa ($29.81 \pm 0.14\%$ en el suelo sin adición de residuos, y $28.77 \pm 0.29\%$ en el suelo con adición de residuos de plantas de maíz) (Figura 9). A nivel de género, miembros de Euglenozoa y Cryptophyta fueron dominantes, e.g. *Leishmania* y *Guillardia* (Figura 10d). El efecto de la aplicación de residuos sobre la estructura protista del suelo fue menor comparado con el efecto de los residuos sobre la estructura bacteriana, y de arqueas, sin embargo, el análisis de componentes principales (PCA) mostró separación entre los tratamientos independientemente del nivel taxonómico. Los dos componentes principales en el PCA explicaron > 90% de la variabilidad de los datos a nivel de filo (Figura 12), y de > 75% a nivel de género (Figura 13).

6.3.7. Estructura viral de suelo

La estructura viral del suelo estuvo dominada por familias del orden Caudovirales: *Siphoviridae* (abundancia relativa, $25.32 \pm 1.77\%$, en su mayoría: *L5virus*) y *Myoviridae* ($25.20 \pm 0.35\%$, en su mayoría: *T4virus*). Se observó diferencias en la dominancia de grupos entre tratamientos: el suelo con adición de residuos estuvo dominado por *Siphoviridae* ($26.67 \pm 0.85\%$) y *Myoviridae* ($25.48 \pm 0.06\%$), y el suelo sin adición de residuos por *Myoviridae* ($24.91 \pm 0.20\%$) and *Siphoviridae* ($23.97 \pm 1.19\%$) (Figura 9 y Figura 10e). La aplicación de residuos afectó la estructura viral del suelo considerando los valores de proporción de cambio (ratios), con valores similares a los cambios de los grupos bacterianos. El análisis mediante PCA mostró separación clara entre los tratamientos, independientemente del nivel taxonómico. Los dos componentes principales en el PCA explicaron $> 70\%$ de la variabilidad de los datos a nivel de filo (Figura 12e), y de $> 60\%$ a nivel de género (Figura 13e).

6.3.8. Análisis de la anotación funcional del metagenoma

Las secuencias ensambladas (*contigs*) anotados contra la base SEED, clasificó las secuencias en 45 categorías funcionales (nivel 1), y en 22 categorías funcionales con la base de familias de proteínas ortólogas (COGs, nivel 2). Las categorías de SEED más abundantes fueron: Carbohidratos ($16.83 \pm 0.09\%$, abundancia relativa del total de *contigs* anotados), y cofactores y vitaminas ($15.19 \pm 0.36\%$), mientras los COGs más abundantes fueron: E (transporte y metabolismo de aminoácidos, $10.39 \pm 0.38\%$) y C (conversión y producción de energía, $9.37 \pm 0.53\%$) (Figura 14).

El suelo con adición de residuos de maíz presentó mayor número de *contigs* anotados para las funcionalidades relacionadas con el metabolismo general (categorías SEED: metabolismo central, metabolismo del nitrógeno y metabolismo del DNA), mientras el suelo sin adición de residuos presentó funciones relacionados con el metabolismo de compuestos

aromáticos, y respuesta al estrés (Figura 15). El análisis mediante PCA mostró separación clara entre la funcionalidad de los tratamientos con y sin adición de residuos (Figura 16).

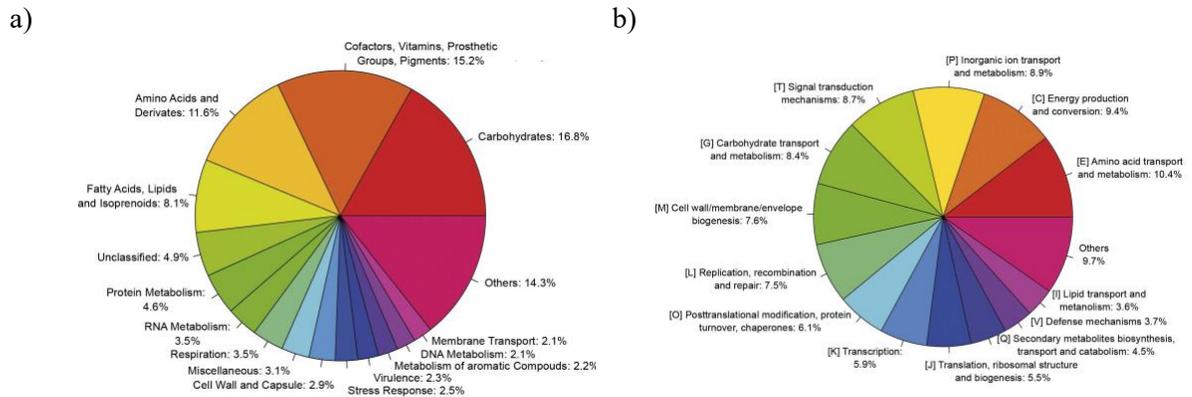


Figura 14. Categorías funcionales del metagenoma del suelo con base en las bases de datos de a) SEED, y b) COGs.

Por otro lado, ambos tratamientos estuvieron dominados por genes relacionados con rutas de metabolismo trófico (degradación de compuestos orgánicos) y síntesis; sin embargo, el suelo con adición de residuos de maíz mostró mayor número de genes relacionados con rutas de degradación, desnitrificación, y reducción de nitrato a amonio (DNRA, por sus siglas en inglés). Genes del proceso de desnitrificación, por ejemplo, *norB*, *nirK*, *nosZ* y *napA*, se encontraron en mayor número en el suelo con adición comparado con el suelo sin adición de residuos.

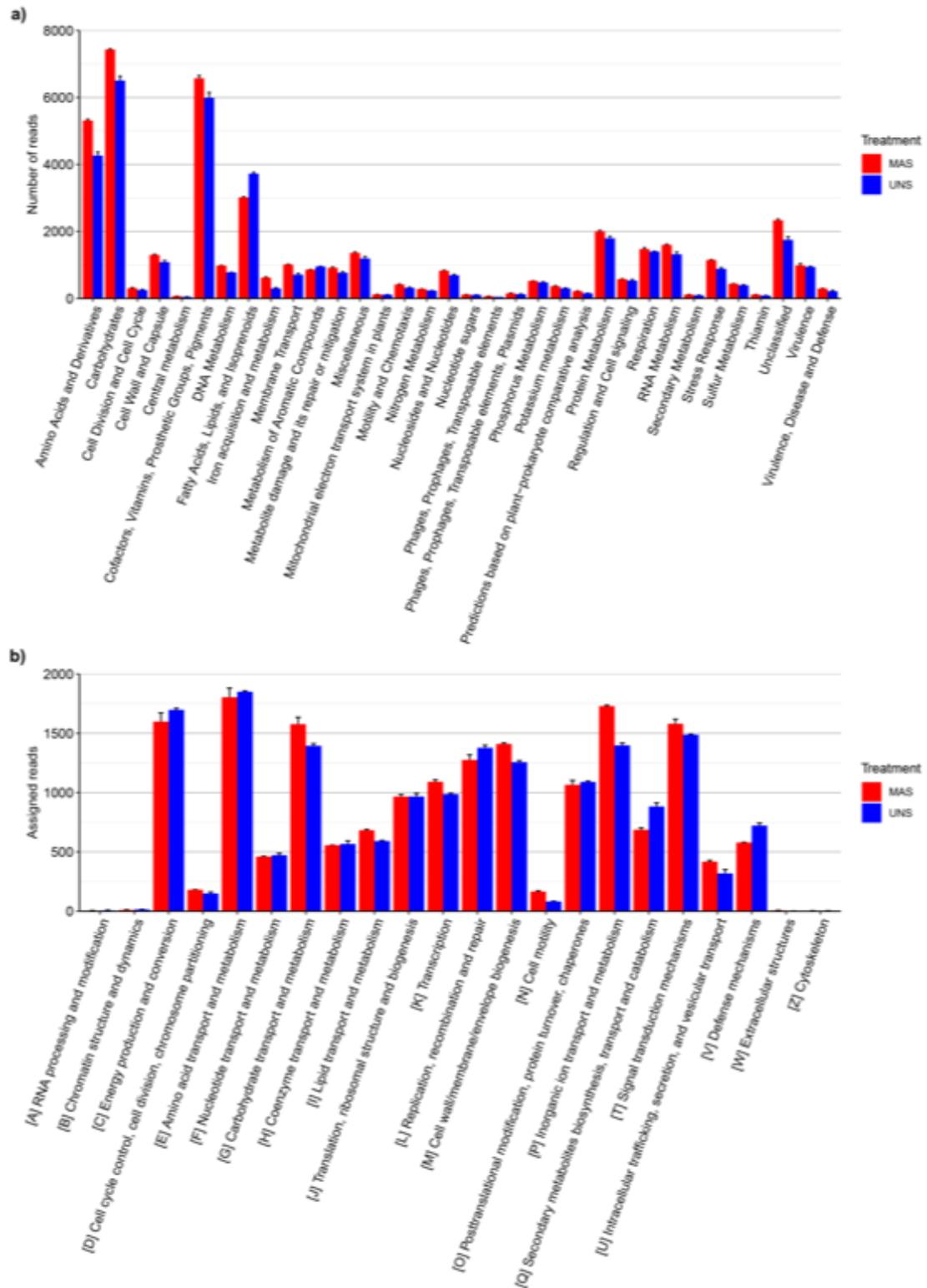


Figura 15. Anotación funcional del metagenoma del suelo con base en a) base de datos SEED, y b) base de datos COGs. UNS, suelo sin adición de residuos, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

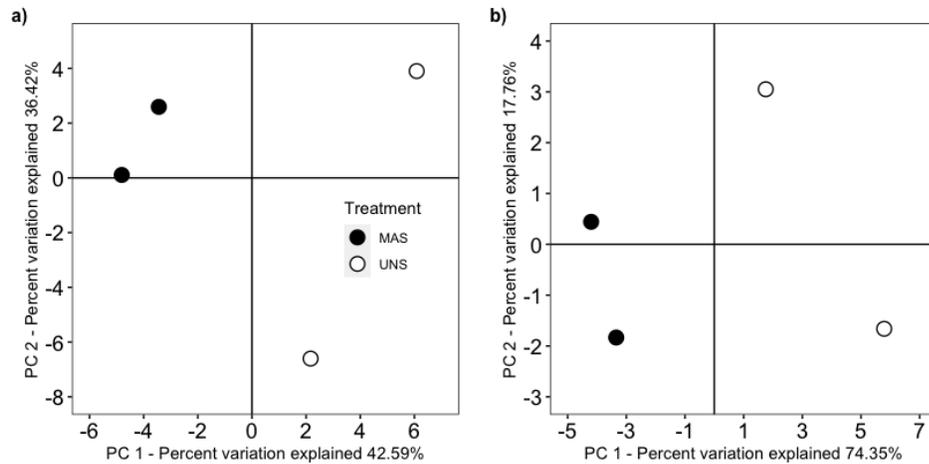


Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) con los datos transformados (clr) de anotación funcional del metagenoma del suelo con base en a) base de datos SEED, y b) base de datos COG. UNS, suelo sin adición de residuos, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

6.3.9. Diversidad funcional del metagenoma del suelo

La diversidad funcional basada en categorías de SEED presentó cambios debido a la adición de residuos de plantas de maíz. El suelo con adición de residuos presentó un valor significativamente menor de diversidad funcional comparado con el suelo sin adición de residuos a valores de $q = 1$ y $q = 2$ ($p < 0.05$) (genes típicos y dominantes, respectivamente). Sin embargo, la riqueza funcional (número de genes detectados) no se vio afectada.

La diversidad funcional basada en categorías COGs no se vio afectada debido a la adición de residuos, sin embargo, mostró mayor diversidad funcional comparada con el suelo sin adición de residuos. Lo anterior indica que el suelo sin adición de residuos estuvo dominado por un grupo reducido de genes o grupos funcionales (Figura 17).

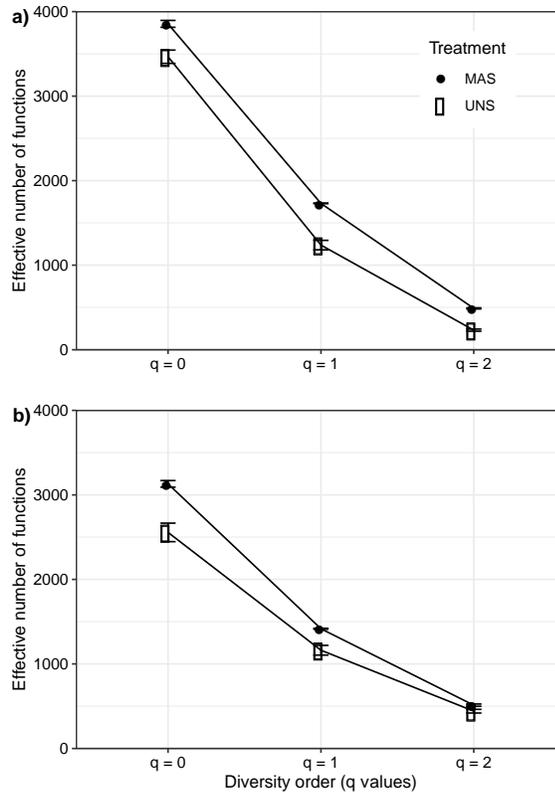


Figura 17. Diversidad funcional del metagenoma del suelo con base en a) la base de datos de SEED, y b) base de datos de COG, empleando los números de Hill. UNS, suelo sin adición de residuos, y MAS, suelo con adición de residuos de plantas de maíz.

6.4. *Discusión*

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de la adición de residuos de plantas de maíz en la composición microbiana y funcional de un suelo sujeto a agricultura de conservación. En este estudio se determinó la estructura microbiana, es decir, la estructura bacteriana, de arqueas, hongos, protistas y virus, y la funcionalidad de un suelo de cultivo mediante el uso de secuenciación directa del DNA i.e. metagenómica.

La riqueza de especies bacteriana fue mayor en el suelo con residuos que en el suelo sin residuos, sin embargo, estuvo dominando por un número reducido de especies; lo anterior con

base en menor diversidad a valores $q = 1$ y $q = 2$. Esto podría explicarse por la dominancia de grupos o estrategias “ r ”, también conocidos como “copiotróficos” –microorganismos de crecimiento rápido en ambientes ricos en materia orgánica de fácil degradación–. Grupos con miembros con estilo metabólico copiotrófico fueron mayormente enriquecidos en el suelo con adición de residuos que en el suelo sin residuos, por ejemplo, miembros de Proteobacteria: Alfa-, Beta- y Gammaproteobacteria. Anteriormente, [Maron et al. \(2018\)](#) observó que el enriquecimiento de las clases Beta- y Gammaproteobacteria en un suelo adicionado con celulosa derivaron en menor diversidad en el suelo.

El número de especies virales (riqueza de especies virales) determinado en el suelo con residuos de maíz fue significativamente menor que en el suelo sin residuos. Su estructura estuvo dominada por dos familias del orden Caudovirales: *Shipoviridae* y *Myoviridae*. El orden viral Caudovirales es conocido por agrupar miembros virales cuyos hospederos son principalmente procariontes, es decir, bacteria y arqueas. El cambio en la estructura procarionte pudo haber afectado la dinámica y composición viral del suelo. Ya que la estructura y composición procarionte puede estar definida por la dinámica o gradiente de nutrientes en el suelo, la estructura y diversidad viral también puede estarlo debido al cambio en sus hospederos ([Adriaenssens et al. 2017](#)).

6.4.1. Cambios en la composición bacteriana del suelo

Dos filos fueron enriquecidos en los suelos con adición de residuos: Proteobacteria y Bacteroidetes, mientras que la abundancia relativa del resto disminuyó comparado con el suelo sin residuos. Ambos grupos se encuentran de manera ubicua en el suelo, junto con Actinobacteria y Acidobacteria ([Jansen, 2006](#); [Fierer et al. 2018](#)). Con anterioridad se ha observado el incremento de estos grupos en suelos enriquecidos con material orgánico como

celulosa o residuos vegetales ([Ransom-Jones et al. 2017](#); [Maron et al. 2018](#); [Lian et al. 2019](#)). Ambos se describen con metabolismo copiotrofo ([Fierer et al. 2007a](#)).

Proteobacteria es uno de los filos bacterianos más versátiles y dentro de éste se distribuyen quimilitoautótrofos, heterótrofos y fototrofos ([Spain et al. 2009](#)), mientras miembros pertenecientes a Bacteroidetes contienen en su genoma mayor número de genes que codifican para enzimas degradadoras de carbohidratos complejos (carbohidratos de alto peso molecular) ([Diamond et al. 2019](#); [Ransom-Jones et al. 2017](#)). Ambos participan activamente en la degradación del material orgánico de alto peso molecular en suelo ([Thomas et al. 2011](#); [Wieczorek et al. 2019](#)), lo que a su vez explica y asegura su ubicuidad y enriquecimiento.

Contrastando, la abundancia relativa de Acidobacteria, Chloroflexi y Nitrospirae fueron menor en los suelos con adición de residuos que el suelo sin adición de residuos. Se ha reportado que su estilo metabólico/ecológico es “oligotrofo”: aquellos microorganismos que crecen en ambientes con nutrientes limitados, con lento crecimiento, pero uso eficiente de recursos ([Fierer et al. 2007b](#); [Kielak et al. 2009](#); [Ramirez-Villanueva et al. 2015](#)). Actinobacteria y Firmicutes disminuyeron en el suelo con adición de residuos, sin embargo, esto contrasta con resultados publicados anteriormente. Por ejemplo, [Ransom-Jones et al. \(2017\)](#) observó el enriquecimiento de Firmicutes en suelos adicionados con residuos de algodón. Firmicutes agrupa miembros que poseen genes que codifican enzimas celulolíticas (degradadores de celulosa), y/o enzimas que degradan quitina ([Ransom-Jones et al. 2017](#); [Wieczorek et al. 2019](#)). La respuesta negativa de Firmicutes en el suelo con residuos pudo haberse relacionado con otros factores, por ejemplo, la composición del material orgánico o factores fisicoquímicos del suelo ([Klaubauf et al. 2010](#); [Maron et al. 2018](#); [Lian et al. 2019](#)).

Dos géneros microbianos fueron dominantes y aumentaron en términos de abundancia relativa en el suelo con adición de residuos: *Streptomyces* (Actinobacteria) y *Lysobacter* (Gammaproteobacteria). El primer grupo se encuentran en alta abundancia en ambientes ricos

en material orgánico (por ejemplo, rizosfera o en suelos forestales) (López-Mondéjar et al. 2016). *Streptomyces* juega un papel importante en el ciclo del C por ser saprofitos (descomponen y se alimentan de material residual animal y vegetal) (Lloyd, 1969; Vurukonda et al. 2018). Miembros de *Lysobacter*, por otro lado, contienen genes que codifican para una maquinaria enzimática muy amplia, por ejemplo, enzimas degradadoras de proteínas, de quitina, e hidroxilasas; su capacidad metabólica/enzimática asegura su presencia, prevalencia y enriquecimiento en ambientes varios.

Entre otros, y en orden jerárquico, los géneros *Pseudoxanthomonas* > *Stenotrophomonas* > *Xanthomonas* > *Lysobacter* > *Sinorhizobium* fueron enriquecidos en el suelo con adición de residuos. Todos con potencial celulolítico (degradadores de celulosa), y relacionados como promotores de crecimiento vegetal (Berlemont and Martiny, 2013). La presencia sinérgica de *Xanthomonas* y *Stenotrophomonas* ha sido reportado puede actuar como control contra patógenos en partes aéreas de *Arabidopsis thaliana* (Berendsen et al. 2018); además, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas* han sido aisladas de raíces de plantas de maíz por formar parte del microbioma central de éstas (Niu et al. 2017; Walters et al. 2018). Lo anterior sugiere la importancia de éstos en los mecanismos de interacción “planta-microorganismo”.

Contrastando, la abundancia relativa de *Nitrosospira* y *Gemmatirosa* disminuyeron en el suelo con adición de residuos. Especies de *Nitrosospira* (Betaproteobacteria) oxidan amoníaco a nitrito (Le Roux et al. 2016), con estilo metabólico oligotrófico, de lento crecimiento, y quimilitoautótrofo (obtienen su energía a partir de la oxidación de elementos minerales; NH₃ ó NO₂⁻, por ejemplo). Lo anterior indica que aún en las condiciones copiotróficas que se identifican en el suelo empleado en este estudio –suelo con retención de residuos de cultivos y fertilización inorgánica en campo– la adición en el laboratorio de residuos orgánicos de fácil degradación en forma de plantas de maíz enriqueció grupos bacterianos copiotróficos, y afectó negativamente a grupos oligotróficos.

Sin embargo, se sabe que el enriquecimiento o reducción de grupos microbianos no sólo dependerá de la adición de residuos orgánicos, sino también por variables ambientales o edáficas. Las características fisicoquímicas del suelo fueron similares en este estudio, así que los cambios observados en la composición bacteriana pudieron ser debido, principalmente, a la adición del residuo orgánico añadido. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la comunidad endofítica de las plantas de maíz pudo haber alterado la composición bacteriana del suelo. Consecuentemente, los cambios observados en el suelo con adición de residuos de plantas de maíz no sólo será resultados de la adición del residuo orgánico, sino también por la adición de la estructura microbiana externa.

La adición de residuos de plantas de maíz incrementó la abundancia relativa de genes asociados a la desnitrificación, mientras en el suelo sin adición de residuos, la abundancia de genes relacionados a la nitrificación fue enriquecida. El mayor número de genes relacionados a la desnitrificación (por ejemplo, *norB*, *nirK* y *nosZ*) determinados en el suelo con adición de residuos pudo haberse relacionado con la presencia de micrositos anóxicos (bajo nivel de oxígeno) en el suelo producto de la mineralización del material orgánico y la consecuente liberación de CO₂. Lo anterior también pudo comprobarse con la presencia de mayor número de genes relacionados a la degradación de compuestos orgánicos en el suelo con residuos que en el suelo sin residuos.

6.4.2. Composición de arqueas en el suelo

Miembros del filo Thaumarchaeota disminuyeron su abundancia relativa en el suelo con adición de residuos de maíz, pero no los miembros del filo Euryarchaeota. Grupos como *Nitrososphaera* y *Nitrosopumilus* disminuyeron en abundancia relativa en el suelo con adición de material orgánico. Ambos pertenecen al filo Thaumarchaeota. Se sabe que miembros de

Thaumarchaeota son de lento crecimiento, fijadores de C (autotróficos), y metabolismo oligotrofo; además de estar ampliamente distribuidos en cuerpos acuáticos y en suelos de cultivo (Nelker et al. 2019), en donde son parte importante de los ciclos del C y N (He et al. 2020). Los resultados mostraron mayor abundancia relativa de arqueas nitrificadores en el suelo sin adición de residuos, que en el suelo con adición de plantas de maíz. Esto podría estar relacionado con su metabolismo oligotrófico, y por la adición de fertilización en el campo, es decir, la presencia de fuente de N mantendría sus poblaciones. Por otro lado, el enriquecimiento de grupos metanogénicos en el suelo con adición de residuos de plantas de maíz, por ejemplo, miembros de Crenarchaeota (e.g. *Desulfurococcus*) y Euryarchaeota (e.g. *Methanococcus* y *Methanocaldococcus*) indicaría la presencia de microambientes anóxicos, que podría estar a su vez relacionado con la mineralización del material orgánico. Lo anterior podría también explicar el aumento en el número de genes relacionados a la desnitrificación. La liberación de CO₂ producto del metabolismo heterotrófico, se sabe, es un promotor del crecimiento de grupos metanogénicos (He et al. 2019).

Aunque la abundancia relativa de algunos géneros de arqueas fueron afectados por la adición de material orgánico, su riqueza y diversidad no fue afectada. Esto podría indicar que la aplicación del material orgánico tiene bajo impacto sobre las poblaciones de Arqueas, al menos en comparación con las bacterias, y tras haber transcurrido tres días después de la aplicación del residuo de maíz. Se observó similitudes entre los grupos de arqueas y bacterias respecto a la teoría de que grupos con estilo metabólico copiotrofo aumentaron en un suelo con disponibilidad de nutrientes, es decir, en el suelo con adición de residuos de maíz, y oligotrofos en uno con menor disponibilidad de nutrientes, es decir, el suelo sin adición de residuos.

6.4.3. Composición de la estructura de hongos del suelo

Se sabe que los hongos llevan a cabo funciones ecológicas importantes; son activos participantes en los ciclos del C en suelo (Frac et al. 2018). Aunque de manera general se sabe que los hongos pueden degradar celulosa, cierto nivel de especialización a nivel molecular puede existir en el genoma de éstos (Wilhelm et al. 2019). De acuerdo con los resultados, la comunidad del suelo estuvo compuesta por los filos Ascomycota, Basidiomycota y Microsporidia. Ascomyco, y los géneros *Fusarium* y *Thielavia* fueron los grupos con mayor abundancia relativa. Ambos, Ascomycota y Basidiomycota son los grupos dominantes en el suelo (Fierer, 2017; Sun et al. 2017; Maron et al. 2018; Murgia et al. 2019). Por su parte, *Fusarium* y *Thielavia* dominan en diferentes tipos de suelo (Moussa et al. 2017; Jia et al. 2018). Los filotipos de *Fusarium* responden positivamente a la disponibilidad de N y al contenido de material orgánico, lo que explicaría su dominancia en los suelos con y sin adición de residuos (Sommermann et al. 2018). Son degradadores de celulosa y participan en la degradación y mineralización de residuos vegetales en el suelo forestal y de cultivos (Lynd et al. 2002; Stursova et al. 2012; Ma et al. 2013).

La descomposición de los residuos de maíz en el suelo depende de la interacción entre la biota del suelo (comunidades microbianas) y las condiciones ambientales y edáficas. Ya que este estudio se basó en el análisis de las poblaciones microbianas tras tres días de agregar material orgánico de fácil degradación, se puede concluir que el tiempo pudo no haber sido suficiente para observar cambios en la población de hongos.

6.4.4. Estructural de la comunidad de protistas en el suelo

El reino Protistas y sus miembros (protistas) son parte esencial de las redes metabólicas heterotróficas en el suelo (Geisen et al. 2018). Su diversidad puede estar definida por la dinámica bacteriana u hongos patógenos, así como de las características edáficas (Xiong et al. 2019). Sin

embargo, la información disponible sobre los cambios en la diversidad su es aún limitada. Estudios recientes se han centrado en los cambios del filo Cercozoa en áreas pastizales (*grassland soils*) (Fiore-Donno et al. 2019), y en los cambios en su diversidad en suelos para cultivo (Zhao et al. (2019). En este estudio, la aplicación de material orgánico de fácil degradación no afectó la diversidad y riqueza de especies de protistas; tampoco se observó cambios fuertes en la abundancia relativa de los grupos identificados. Se identificó que el filo Cryptophyta fue enriquecido en el suelo con adición de residuos; su enriquecimiento podría estar relacionado con su actividad depredadora de bacterias, aunque muchos de sus miembros, se sabe, son autotróficos (Grujic et al. 2018).

6.4.5. Estructura viral del suelo

Se conoce que la diversidad de virus en el suelo es grande, y no necesariamente conocida (Yin and Fischer, 2008; Williamson et al. 2017; Emerson et al. 2018). Además, la falta de un marcador molecular, es decir, un gen (o región conservada) que permita su identificación o agrupación limita su investigación. Los virus pueden afectar la dinámica de sus hospederos (estructura procarionte en suelos), y por ello, tener un impacto a nivel ecosistema (Emerson et al. 2018); en el sentido de que pueden modular los genes relacionados con el metabolismo básico de los hospederos (Trubl et al. 2018).

Los resultados mostraron que las familias virales dominantes no fueron afectadas por la adición de residuos orgánicos, pero sí los géneros dominantes. Ambos tratamientos, enmendado con residuos y sin enmendar, estuvieron dominados por *Sophiviridae* y *Myoviridae*. Ambas familias pertenecen al orden viral Caudovirales. Caudovirales es el grupo dominante en suelos con elevada diversidad vegetal (Segobola et al. 2018), y sus miembros, por ejemplo, *Siphoviridae*, han sido reportados en permafrost (Emerson et al. 2018).

La estructura viral del suelo es altamente variable. Por ejemplo, Graham et al. (2019) reportó elevada carga viral en la rizósfera en suelos con pastura (*grassland soil*) y suelos forestales, y que las condiciones ambientales definieron su estructura. Los resultados de este estudio mostraron menor riqueza y diversidad viral en los suelos con adición de residuos que el suelo sin residuos. Producto de la adición de residuos orgánicos, la dinámica microbiana se ve afectada, así como el número hospederos virales, y a su vez, esto afecta la diversidad viral. El enriquecimiento de un número limitado de grupos microbianos, por ejemplo, bacterias copiotróficos, puede llevar a la pérdida de hospederos y de la diversidad viral.

6.4.6. Funcionalidad y diversidad del metagenoma

La estructura funcional del suelo estuvo dominada por funciones relacionadas al metabolismo microbiano basal, por ejemplo, metabolismo de C, producción y conversión energéticas, y metabolismo y transporte de aminoácidos. Anteriormente, se han observado respuestas similares a la adición de residuos al suelo (Souza et al. 2015; Suleiman et al. 2018). Estas funciones están relacionadas con la maquinaria constitutiva microbiana que les permite desarrollarse. Sin embargo, la adición al suelo de residuos de maíz afectó su metagenoma. El suelo con adición de residuos de maíz presentó mayor número de secuencias relacionadas con rutas metabólicas comunes como lo son: metabolismo de C, aminoácidos, y transporte y metabolismo de carbohidratos, metabolismo central, adquisición de Fe, y metabolismo de compuestos nitrogenados, comparado con el suelo sin adición de residuos de maíz.

El enriquecimiento de genes funcionales basales pudo estar relacionado con el mayor contenido de N disponible, y de compuestos orgánicos de fácil degradación en el suelo con adición de residuos de maíz; un ambiente copiotrófico incrementa el metabolismo heterotrófico y la emisión de CO₂ (Souza et al. 2015; Suleiman et al. 2018). Sin embargo, la abundancia

relativa de genes relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos y metabolitos secundarios no fue afectado por la adición de residuos de maíz en el suelo. Observación que contrasta con resultados anteriores en suelos de cultivo con adición de residuos ([Souza et al. 2015](#); [Wu et al. 2018](#)). Por otra parte, la diversidad funcional fue afectada por la adición de residuos de maíz. El suelo con adición de residuos presentó mayor riqueza (número de genes) que el suelo sin adición de residuos. La mineralización de los compuestos de C complejos provenientes de los residuos (e.g. celulosa o lignina), y la liberación de carbohidratos de fácil degradación podrían explicar, en parte, la mayor riqueza funcional en el suelo enmendado. La baja redundancia, es decir, mayor diversidad funcional, indica mayor especialización en la degradación de metabolitos.

No sólo la dinámica de nutrientes puede afectar la diversidad funcional en el suelo; factores edáficos y la perturbación del suelo puede definirla también. Por ejemplo, anteriormente se ha observado el incremento de genes relacionados al metabolismo del DNA, metabolismo de aminoácidos y sus derivados, y el metabolismo de carbohidratos debido a la rotación de cultivos o monocultivos, así como por efecto de cambio de uso de suelo (e.g., forestal a cultivo) ([Souza et al. 2015](#); [Wu et al. 2018](#); [Muñoz-Arenas et al. 2018](#)).

6.5. Conclusión

La adición de residuos de maíz afectó a grupos con la habilidad de degradar compuestos de alta complejidad e incrementó la liberación de carbohidratos simples. El suelo sin adición de residuos estuvo dominado por microorganismos nitrificadores. Esto refuerza la idea de un sistema oligotrofo en el suelo sin adición de residuos comparado con el suelo con adición de residuos. Éste último mostró un sistema copiotrofo. El número de genes relacionados al metabolismo basal microbiano incrementó en el suelo con adición de residuos, pero también los

genes relacionados con la desnitrificación; esto podría relacionarse con la formación de micrositios anóxicos durante la mineralización del residuo de maíz agregado al suelo. Los genes relacionados a la nitrificación fueron más abundantes en el suelo sin adición de residuos. Lo anterior podría ser consecuencia del mayor contenido de N disponible para nitrificadores en el suelo sin adición de residuos; esto en comparación con el suelo con adición de residuos en donde la degradación del material orgánico estimuló la inmovilización de N.

Por último, la diversidad viral se relacionó con la dinámica procarionte, dado su requerimiento obligado de hospederos. Los resultados obtenidos en esta investigación resaltan la importancia de la cómo las comunidades microbianas responden a la adición de material orgánico, y su investigación. Especialmente en la línea del uso creciente de la agricultura de conservación y la retención de cultivos a nivel global.

VII. Capítulo II. *Ammonium alters the bacterial community structure in soil under different management practices: a laboratory study*

7.1. Introducción

Los microorganismos son vitales para el ecosistema ya que son estos quienes llevan a cabo el reciclado de los nutrientes mediante los ciclos de carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P), por mencionar algunos (Falkowski et al. 2018). El N es vital para el crecimiento vegetal y es reducido a través de la conversión de nitrógeno molecular a amonio (NH_4^+) por medio de microorganismos fijadores de N; aquellos en relación simbiótica con las plantas, o de vida libre.

Cuando el amonio está disponible, sufre el proceso de nitrificación –dinámica mediada por procariontes nitrificadores– en el que el amonio es convertido a nitrito (NO_2^-) y luego a nitrato (NO_3^-). Los nitrificadores juegan un papel muy importante en el ecosistema global; su actividad está mediada por múltiples factores como la disponibilidad de amonio, el pH, humedad, temperatura y uso de suelo (Anderson and Levine, 1986; Li et al. 2018).

En México, las prácticas agrícolas incluyen generalmente el monocultivo de maíz (*Zea mays* L.), arado del suelo y la remoción de los residuos de cultivo, además de cantidades variables de fertilizantes. El rastrojo se quema o se emplea para alimento en la ganadería. El uso intensivo con fines de cultivo reduce el contenido de materia orgánica del suelo, y provoca pérdida de su fertilidad. La pérdida de material orgánico es debido a la remoción del residuo de los cultivos, y por el arado, que rompe la estructura del suelo y expone a oxidación constante el material orgánico del suelo.

La pérdida de materia orgánica del suelo y los cambios en su textura reduce la infiltración de agua, y la ausencia de cobertura puede promover la erosión. La agricultura de conservación

(CA) que incluye movimiento reducido del suelo, rotación de cultivos y la retención de residuos de cultivos en la superficie, ha surgido como alternativa para desacelerar la pérdida de fertilidad del suelo and incluso revertirla (Chahal et al. 2020). El experimento de larga duración establecida por el CIMMYT en valle del Yaqui (cerca de Ciudad Obregón, Sonora) al noroeste en México investiga –desde 1992– el efecto de la labranza y manejo de residuos, agricultura de conservación y rotación de cultivos en la calidad del suelo; por ejemplo, las características físicas y químicas del suelo (Verhulst et al. 2011).

Aún se desconocer cómo las prácticas agrícolas contrastantes, CA vs CP, y la aplicación de N inorgánico afectan la población bacteriana del suelo y su actividad. Por lo tanto, suelos con agricultura de conservación con retención de residuos cultivo, y de agricultura convencional con retención y/o quema de residuos de cultivo, sin fertilización de N-inorgánico fueron muestreados del centro de larga experimentación. Las muestras de suelo se llevaron al laboratorio para su análisis metagenómico. En el laboratorio, las muestras fueron enmendadas con 300 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ o sin enmendar, e incubadas por 56 días de forma aeróbica. Durante la dinámica se monitorearon el contenido de N inorgánico, la estructura microbiana, y la emisión de CO_2 del suelo. El objetivo de este estudio fue determinar cómo las poblaciones microbianas del suelo fueron afectadas por i) las diferentes prácticas agrícolas, y ii) la aplicación de NH_4^+ bajo condiciones controladas en el laboratorio.

7.2. Materiales y métodos.

7.2.1. Muestro y caracterización de suelos

El muestreo se realizó en el campo experimental Norman E. Borlaug (CENEB), ubicado en Ciudad Obregón, Sonora (México) (Figura 3) en abril de 2016. Los detalles del campo

experimental se describen en la sección 5.2.1. En este estudio se emplearon tres prácticas agrícolas: i) camas permanentes con retención de cultivos y agricultura convencional (CT), ii) camas permanentes con retención de cultivo y quema de residuos (PBB; agricultura de conservación), y iii) camas permanentes con retención de cultivos (PBB; agricultura de conservación). Se tomaron diez submuestras aleatoriamente (500 g) de la capa del suelo de 0-15 cm de cada réplica de campo ($n = 3$), y se mezclaron por separado. Obteniéndose así 9 muestras compuestas de suelo, es decir, tres tratamientos con tres réplicas cada uno ($n = 9$). El suelo se dejó secar en invernadero, se tamizó a 2 mm de tamaño de partícula y se determinaron sus características físicas y químicas: pH, carbono total (TOC), nitrógeno total (TN), capacidad de retención de agua (WHC), humedad, conductividad electrolítica (EC), y textura (ver detalles en sección 5.2.1).

7.2.2. *Microcosmos: Diseño y dinámica experimental*

Dieciséis muestras de 50 g de cada práctica ($n = 3$), y réplica de campo ($n = 3$) fueron dispuestas en frascos de 120 ml, y ajustados al 40% de WHC. Éstos fueron dispuestos en frascos de 1 l, junto a un frasco pequeño con 20 ml de NaOH 1 M para la captura del CO₂ (Jenkinson and Powlson, 1976). Los frascos de 1 l fueron sellados y pre-incubados durante siete días; éstos fueron aireados cada 48 h para mantener condiciones aerobias.

Tras siete días de pre-incubación, la mitad de las muestras de suelo ($n = 72$) fueron enmendadas con lo equivalente a 300 mg (NH₄⁺)₂SO₄-N kg⁻¹ suelo (considerado el suelo con adición de N); y a la otra mitad ($n = 72$) se le adicionó lo equivalente en volumen de agua destilada (considerados muestras control o sin adición de N). El suelo fue homogeneizado en ambos tratamientos. Posteriormente, un frasco de cada réplica de campo ($n = 3$), y cada práctica agrícola ($n = 3$) con y sin adición de N fue seleccionado al azar y empleado para la extracción

de N mineral con 80 ml de sulfato de potasio 0.5 M (K₂SO₄) empleando 20 g de muestra. De la misma unidad experimental, 10 g de suelo fueron conservado a -20 °C para su posterior extracción de DNA. Este procedimiento fue considerado como el día cero de la dinámica. Los frascos restantes fueron sellados e incubados durante 56 días. Tras 1, 3, 5, 7, 14, 28 y 56 días, un frasco de cada tratamiento y réplica, con y sin adición de N fue tomado al azar. Éstos fueron abiertos, el NaOH removido y sellado para su posterior análisis de CO₂. El suelo fue removido, y parte de él se uso para la determinación de N mineral y extracción de DNA, tal y como se describió anteriormente.

7.2.3. Extracción de DNA total de suelo y amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA

A partir de las muestras de suelo se extrajo el material genómico de dos pseudo-réplicas de 500 mg de cada réplica de campo empleando tres métodos de extracción. Es decir, se emplearon 9 g de cada tratamiento para su extracción: 2 pseudo-réplicas × 3 métodos de extracción × 3 réplicas de campo × 500 mg de muestra = 9 g suelo. Las técnicas se basaron en lisis celular química, enzimática, térmica, mecánica, y/o su interacción (Hoffman y Winston, 1986; Sambrook y Rusell, 2001; Valenzuela-Encinas et al. 2008). El DNA metagenómico fue conservadas a -20 °C en solución Tris-HCl (1 mM) hasta su posterior uso.

La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA bacteriano fue empleando los iniciadores 341-F (5'-CCTACGGGIGGCWGCAG-3') y 805-R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al. 2011), siguiendo el protocolo de Illumina Inc.: “16S metagenomic sequencing library preparation” (15044223 Rev. B). Se realizaron amplificaciones en triplicado para cada muestra de DNA metagenómico ($n = 144$), siguiendo las condiciones en Navarro-Noya et al.

(2013). En cada grupo (*batch* o *set*) de amplificación, un control negativo, es decir, una reacción de PCR sin DNA, fue corrida para comprobar la integridad de los reactivos.

Los amplicones por triplicado de cada muestra fueron mezclados y purificados empleando el kit comercial FastGene™ (Nippon Genetics, Co., Ltd). Los amplicones purificados fueron cuantificados mediante el ensayo PicoGreen® de Invitrogen en NanoDrop™ 3300 (Thermo Scientific In., Suwanee, CA), y mezclados de manera equimolar para su posterior secuenciamiento. El secuenciamiento fue realizado mediante el servicio externo de Macrogen Inc. (Seúl, Korea) empleando la plataforma Illumina Mi-Seq 2x300 *paired-end*. Las secuencias fueron sometidas a la base de datos del SRA-NCBI bajo el número de “*BioProject*”: [PRJNA545497](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA545497).

7.2.4. Análisis bioinformático

Las secuencias fueron analizadas empleando los *scripts* del software QIIME v1.9 (Caporaso et al. 2010), de acuerdo con lo siguiente: a) La unión de las secuencias pareadas (*assembly of paired-end reads*) fue realizado con el algoritmo *fastq-join* empleando un traslape de 100 nucleótidos ($-j$ 100) para asegurar la unión de las dos regiones amplificadas, V3–V4. El tamaño aproximado del amplicón fue de 490 pb. b) Extracción de *barcodes*: Cada muestra de ADN metagenómico fue amplificada junto a un identificador único (“*barcode*”): una secuencia de 8pb en cada extremo. Dicha secuencia se extrajo de cada librería empleando el comando *extract_barcodes.py*. c) *Demultiplexing*: proceso que conlleva la agrupación de cada secuencia de DNA junto a su etiqueta o código único (“*barcode*”). Este proceso se llevó a cabo con el comando *split_libraries_fastq.py*. d) Identificación y remoción de secuencias quiméricas: Los amplicones quiméricos son aquellos amplicones producto de la mezcla de dos regiones de genes

de distinto genoma. Esto sucede debido a los errores intrínsecos a la técnica de amplificación. Su eliminación fue a través del alineamiento de las secuencias obtenidas en (c) contra una base de referencia (i.e., GreenGenes v13_8). La identificación y remoción de quimeras se realizó con los comandos *identify_chimeras.py* y *filter_otus_from_otu_table.py*, respectivamente. e) Agrupación de OTU's_{97%} (unidad taxonómica operacional): La agrupación por OTUs se llevó a cabo con el comando *pick_open_otus.py* (ajustes usados: -m usearch61, -s 0.01, -aO 4). Tras la agrupación de OTUs al 97% de similitud (*default settings*), la asignación taxonómica se realizó mediante el alineamiento contra la base de datos del GreenGenes (v13_8). La abundancia relativa, y el número de secuencias por OTU (i.e., *counts*), se obtuvieron con los comandos *summary_taxa.py* y *biom-convert*, respectivamente.

7.2.5. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó en el *software* “R” v3.6 (R Core Team, 2018). El método de análisis de varianza simple (ANOVA *one-way*) se empleó para determinar diferencias en las características fisicoquímicas de los suelos entre los tratamientos. El método de comparación múltiple Tukey-HSD se empleó para determinar diferencias entre las medias de los tratamientos y se determinó significancia si el valor p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$). El análisis de los grupos taxonómicos afectados se evaluó con la función “aldex.kw” de la paquetería ALDEx2 de acuerdo con lo propuesto por Gloor et al. (2017) y Fernandes et al. (2015). Lo anterior evita la aseveración de cambios en grupos microbianos debido a la naturaleza “composicional” (abundancia relativa y no valores absolutos) en la secuenciación masiva.

La visualización de la abundancia relativa se realizó mediante mapas de calor (de ahora en adelante “*heatmaps*”), con el promedio por tratamiento y día, de los datos taxonómicos. El

análisis multivariado (análisis de componentes principales: PCA) se empleó para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los grupos taxonómicos. Para determinar el efecto de los factores principales (prácticas, adición de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y tiempo) sobre los grupos microbianos, el método no paramétrico de “análisis multivariado por permutaciones” (*permutational multivariate analysis*, perMANOVA) se realizó con la paquetería “Vegan” (Oksanen et al. 2018).

7.3. Resultados

7.3.1. Mineralización de carbono y nitrógeno

Tras 56 días del experimento, la cantidad de CO_2 liberado por tratamiento fue en el orden $\text{CT} > \text{PBC} > \text{PBB}$ (Figura 18). La aplicación de amonio incrementó significativamente la cantidad de CO_2 liberado 2.6 veces comparado con el suelo sin adición de amonio tras 56 días del experimento ($F_{(1,12)} = 127.6, p < 0.001$). No hubo diferencia significativa en la emisión de CO_2 entre prácticas agrícolas independientemente de la adición de amonio. El contenido de amonio en el suelo sin adición de amonio fue similar entre las prácticas agrícolas ($< 11 \text{ mg N kg}^{-1}$ suelo) (Figura 19a). La cantidad de amonio en el suelo con adición de amonio, sin embargo, disminuyó rápidamente, y fue determinado en $< 4 \text{ mg N kg}^{-1}$ de suelo después de 56 días. Tras 14 días, la concentración de NH_4^+ en el tratamiento PBB fue significativamente mayor que CT y PBC, pero no en los siguientes días de la dinámica ($p < 0.05$). La concentración de nitrito (NO_2^-) fue $< 0.2 \text{ mg N kg}^{-1}$ en el suelo sin adición de amonio, sin embargo, la adición de N incrementó dicho contenido (Figura 19b). La concentración máxima de NO_2^- determinada en suelo fue tras 3 días, y posteriormente, disminuyó hasta ser indetectable tras 56 días. La

concentración de nitrato (NO_3^-), por otro lado, permaneció $< 13 \text{ mg N kg}^{-1}$ en el suelo sin adición de amonio, pero la aplicación de éste lo incrementó significativamente (Figura 19c).

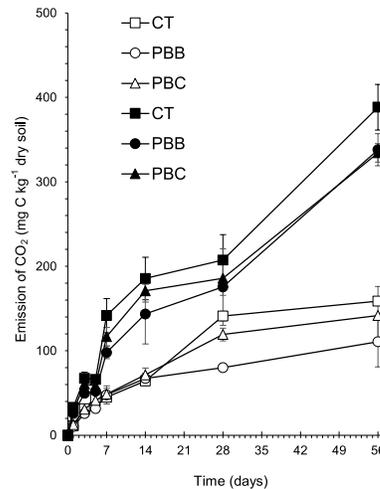


Figura 18. Dinámica acumulativa de CO_2 . Suelo con práctica convencional y retención de cultivos sin adición de amonio (CT, □) o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (CT, ■), camas permanentes con retención y quema de residuos de cultivo sin adición de amonio (PBB, ○) o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (PBB, ●), camas permanentes con retención de cultivos sin adición de amonio (PBC, △) o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (PBC, ▲).

7.3.2. Resultado de la secuenciación y diversidad microbiana en el suelo

A partir de las 144 muestras, se obtuvieron 1.5×10^6 secuencias ensambladas de la región V₃-V₄ del gen 16S rDNA, con calidad y libre de quimeras. Las curvas de rarefacción mostraron tendencia asintótica, lo que significa que mayor profundidad no aumentaría el número de OTUs en gran medida. El índice “good’s coverage” fue de 83% (promedio de todas las muestras), y se pudieron identificar 38 filos bacterianos, 111 clases, 180 ordenes, 235 familias, y 387 géneros. La diversidad bacteriana, con base en el número de especies efectivas, mostró valores similares entre los tratamientos en el suelo sin adición de amonio, sin embargo, la adición de éste afectó su dinámica. Se observó pérdida de riqueza de especies ($q = 0$) en el suelo con amonio después de tres días, y una recuperación al final del experimento.

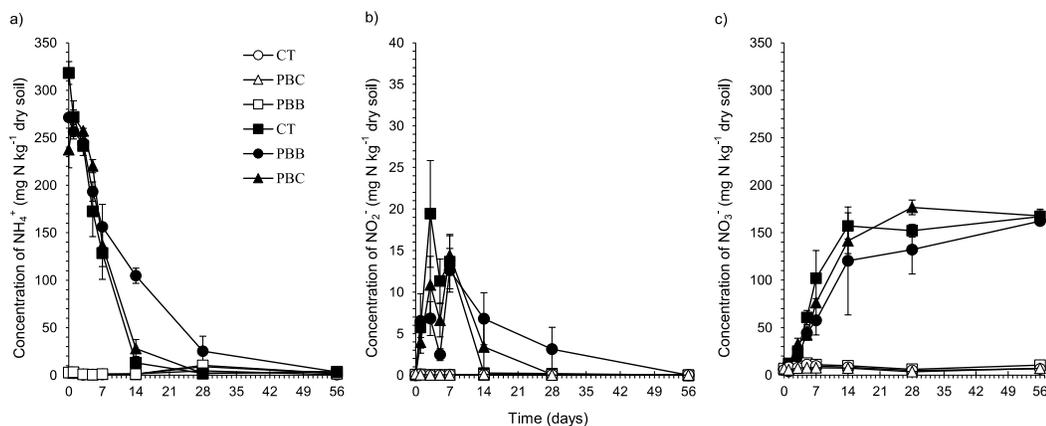


Figura 19. Dinámica de mineralización de N, a) amonio (NH₄⁺), b) nitrito (NO₂⁻), y c) nitrato (NO₃⁻). Suelo con práctica convencional y retención de cultivos sin adición de amonio (CT, □) o con adición de 300 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ (CT, ■), camas permanentes con retención y quema de residuos de cultivo sin adición de amonio (PBB, ○) o con adición de 300 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ (PBB, ●), camas permanentes con retención de cultivos sin adición de amonio (PBC, △) o con adición de 300 mg NH₄⁺-N kg⁻¹ (PBC, ▲).

7.3.3. La estructura bacteriana del suelo definida por las prácticas agrícolas

La estructura bacteriana de suelo al inicio del experimento estuvo dominada por Proteobacteria (51.51±4.04%, dominado por Gammaproteobacteria 20.15 ±5.38%), Acidobacteria (26.60±3.71%, dominado por Acidobacteria-6 9.56±1.25%) y Firmicutes (5.97±1.47%, dominado por Bacilli 5.26±1.41) (Figura 20a). Y a nivel de género, el suelo estuvo dominado por *Halomonas* (12.68±3.11%, del filo Proteobacteria) y *Bacillus* (3.11±1.01%, del filo Firmicutes) (Figura 20b).

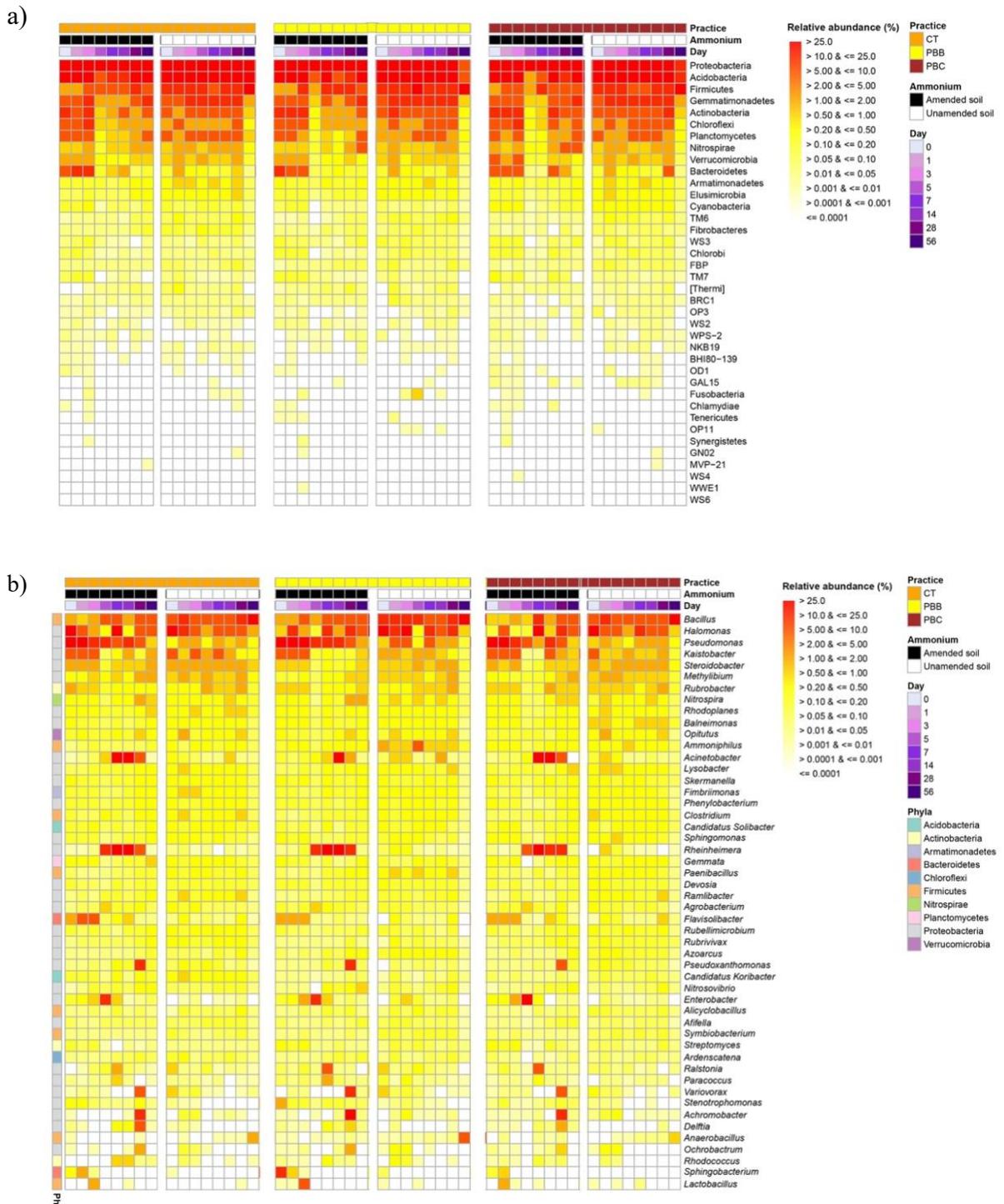


Figura 20. Heatmap con la abundancia relativa (%) de filos bacterianos en el suelo con práctica convencional con retención de residuos (CT), práctica de conservación con camas permanentes y quema de residuos (PBB), y práctica de conservación con camas permanentes y retención de cultivos (PBC).

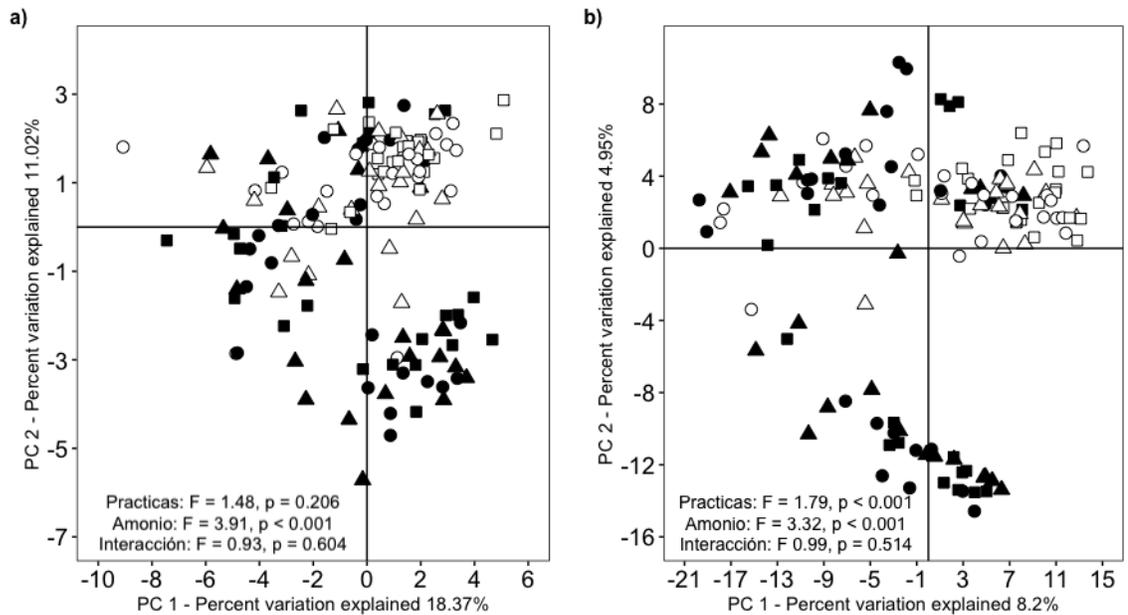


Figura 21. Análisis de componentes principales (PCA) y análisis multivariado con permutaciones (perMANOVA) del efecto de la adición de amonio y prácticas agrícolas en la estructura bacteriana del suelo. Suelo con camas permanentes y arado convencional y retención de cultivos sin adición de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (CT, \square) o con $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (CT, \blacksquare), camas permanentes con quema de residuos sin adición de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (PBB, \circ) o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (PBB, \bullet), camas permanentes con retención de cultivos sin adición de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (PBC, \triangle) o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$ (PBC, \blacktriangle).

Con base en el análisis diferencial (función `aldex.kw`), se observó que un mayor número de grupos bacterianos a nivel de género fueron significativamente afectados por las prácticas agrícolas en suelo sin adición de amonio comparado con el suelo con adición de amonio ($p < 0.05$, Cuadro 3). Por ello el análisis de componentes principales mostró la separación entre los suelos con y sin adición de NH_4^+ , y en menor grado por las prácticas agrícolas. Adicionalmente, el análisis mediante perMANOVA mostró que la estructura bacteriana fue significativamente afectada por la adición de amonio ($p < 0.001$), y luego por las prácticas agrícolas ($p < 0.05$), independientemente del nivel taxonómico (Figura 21).

Por otro lado, con base en el análisis mediante PCA y perMANOVA, tanto las prácticas agrícolas como el tiempo de incubación afectaron significativamente la estructura bacteriana en el suelo con y sin adición de NH_4^+ (Figura 22, $p < 0.004$). Sin embargo, la aplicación de amonio

afectó de manera inmediata la estructura bacteriana del suelo; el análisis mediante PCA mostró el agrupamiento claro de la estructura bacteriana del suelo con NH_4^+ respecto al tiempo, agrupándose en i) los días 0, 1 y 3, ii) los días 5, 7 y 14, y iii) días 28 y 56 (Figura 22b).

Cuadro 3. Análisis diferencial de la composición bacteriana del suelo (aldex.kw). Efecto de prácticas agrícolas (CT, PBB, ó PBC) sobre grupos bacterianos en suelo sin adición de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, y con adición de 300 mg de $\text{NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$, mediante análisis de datos composicionales (ALDEx2, Gloor et al. 2019).

Suelo sin enmendar		Suelo con 300 mg $\text{NH}_4^+\text{-N kg}^{-1}$	
Cyanobacteria ^a	8.21×10^{-5} ^b		
Fibrobacteres	1.78×10^{-3}		
<i>Candidatus Koribacter</i>	5.16×10^{-7}	<i>Candidatus Koribacter</i>	1.11×10^{-3}
<i>Rubellimicrobium</i>	2.96×10^{-5}	<i>Ammoniphilus</i>	3.49×10^{-3}
<i>Rubrivivax</i>	4.02×10^{-5}	<i>Bradyrhizobium</i>	2.29×10^{-2}
<i>Steroidobacter</i>	3.93×10^{-4}	<i>Sphingobium</i>	3.79×10^{-2}
<i>Bradyrhizobium</i>	6.38×10^{-4}		
<i>Ammoniphilus</i>	1.46×10^{-3}		
<i>Methylibium</i>	2.51×10^{-3}		
<i>Rhizobium</i>	1.46×10^{-2}		
<i>Hyphomicrobium</i>	1.72×10^{-2}		
<i>Kaistobacter</i>	1.95×10^{-2}		
<i>Fimbriimonas</i>	2.71×10^{-2}		
<i>Sphingobium</i>	2.94×10^{-2}		
<i>Bacillus</i>	3.02×10^{-2}		
<i>Candidatus Solibacter</i>	3.20×10^{-2}		
<i>Gemmata</i>	3.44×10^{-2}		
<i>Rhodoplanes</i>	3.77×10^{-2}		
<i>Myxococcus</i>	4.01×10^{-2}		
<i>Ajfifella</i>	4.29×10^{-2}		
<i>Ardenscatena</i>	4.71×10^{-2}		

^a Sólo grupos bacterianas asignados a nivel de filo o género significativamente afectados por las prácticas agrícolas $P < 0.05$, ^b Los valores obtenidos del análisis de Kruskal-Wallis para cada grupo bacteriano obtenido mediante la función aldex.kw empleando los valores transformados (transformación clr) con la paquetería ALDEx2.

7.3.4. La estructura bacteriana del suelo definida por la aplicación de 300 mg $\text{NH}_4^+ \text{kg}^{-1}$

La aplicación de amonio al suelo afectó de manera inmediata y altamente significativa la estructura bacteriana del mismo comparado con el suelo sin adición de amonio

independientemente de la práctica agrícola i.e. CT, PBB o PBC (Figura 23). De acuerdo con el análisis de PCA y perMANOVA, la estructura bacteriana del suelo se separó entre suelos sin enmendar y enmendados, y también a través del tiempo. El efecto de la aplicación de amonio separó la comunidad bacteriana durante los primeros tres días (0, 1 y 3), y el fue más evidente en los suelos con práctica agrícola convencional (CT) con base en el estadístico F (Pseudo-F, Figura 23a). El análisis diferencial con base en aldex.kw, mostró que un mayor número de grupos a nivel de género fueron significativamente afectados por la aplicación de amonio en los suelos con agricultura convencional (CT) que en los de conservación (PBB o PBC) (Cuadro 4).

7.3.5. Análisis “*in silico*” del metagenoma del suelo: predicción funcional

El potencial funcional del metagenoma del suelo estuvo dominado por las rutas metabólicas, basados en la base de datos de “*Kyoto Encyclopedia of genes and genomes*” (KEGG), del metabolismo de aminoácidos ($10.2 \pm 0.7\%$) y metabolismo de carbohidratos ($10.1 \pm 0.5\%$). Los genes putativos del ciclo del N dominantes fueron los relacionados con el transporte y asimilación de compuestos nitrogenados, por ejemplo, COG2146 (subunidad de nitrato reductasa) y COG0174 (glutamina sintetasa). El análisis multivariado mostró que las rutas metabólicas basadas en el KEGG fueron afectadas significativamente por las prácticas agrícolas (perMANOVA, $p < 0.05$), mientras que los genes putativos de N fueron significativamente afectados por ambos, las prácticas y la adición de N ($p < 0.001$). La visualización mediante PCA evidenció el enriquecimiento de rutas relacionadas al transporte y metabolismo y genes relacionados con la asimilación de N en el suelo sin adición de N (“*transport and catabolism*”, “*amino acid metabolism*”, “*glutamine synthetase*”), y en el suelo con adición de N se enriquecieron rutas relacionadas al catabolismo, transcripción, y genes en

la desnitrificación (“*carbohydrate metabolism*”, “*transcription*”, “*nitrate reductases*”) (Figura 24).

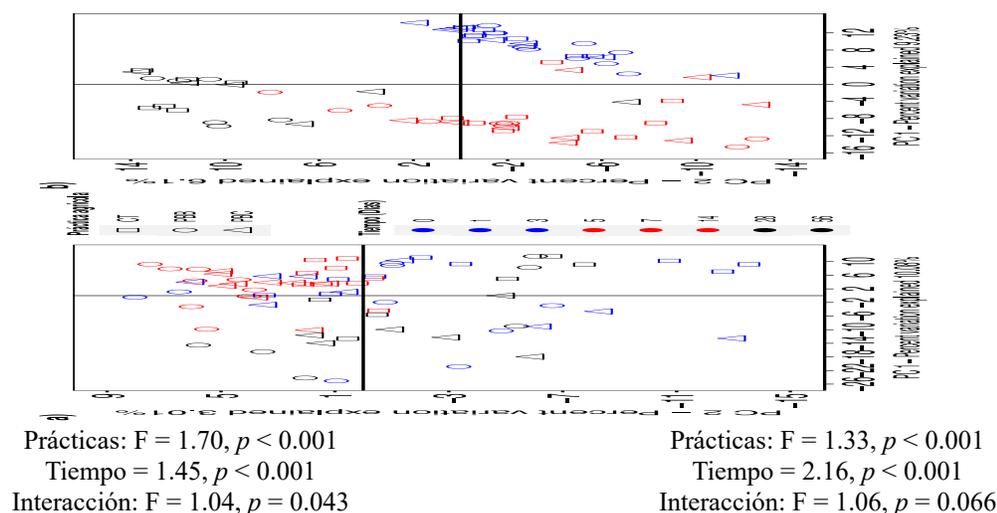


Figura 22. Análisis de componentes principales (PCA) del efecto de las prácticas agrícolas (CT, PBB o PBC) y el tiempo (días) sobre los grupos asignados a nivel de género en a) suelo sin adición de NH_4^+ , y b) suelo con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ suelo seco. Suelo con camas permanentes y arado convencional (CT, \square), camas permanentes con quema de residuos (PBB, \circ), camas permanentes con retención de cultivos (PBC, \triangle). Los colores indican los días evaluados durante el experimento: azul (días 0, 1 y 3), rojo (días 5, 7 y 14) y negro (días 28 y 56).

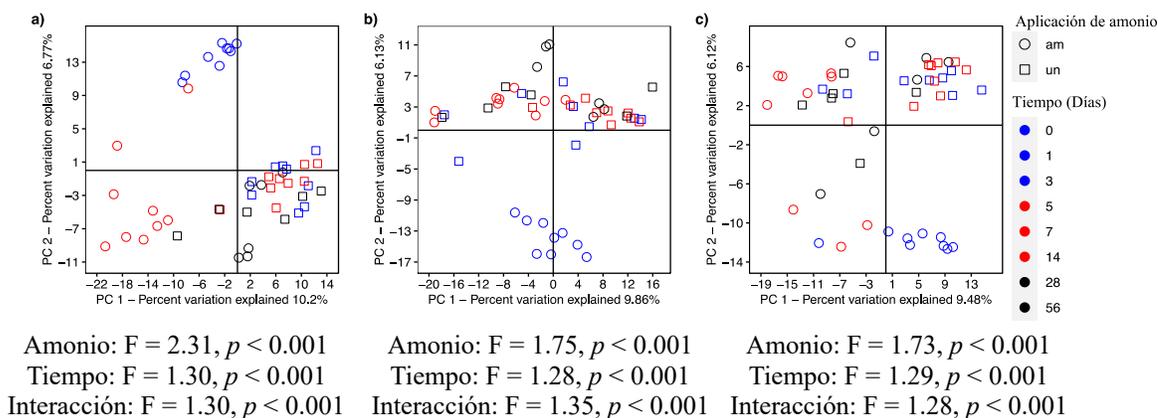


Figura 23. Análisis de componentes principales (PCA) y perMANOVA del efecto la adición de amonio (suelo sin adición o con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+ \text{ N kg}^{-1}$ suelo), tiempo y su interacción en la estructura bacteriana a nivel de género en a) suelo con camas permanentes y arado convencional (CT), b) camas permanentes con quema de residuos (PBB), y c) camas permanentes con retención de cultivos (PBC). Los colores indican los días evaluados durante el experimento: azul (días 0, 1 y 3), rojo (días 5, 7 y 14) y negro (días 28 y 56). Las formas indican el nivel de aplicación de amonio: suelo con adición de $300 \text{ mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ (am, \circ), suelo sin adición de NH_4^+ (un, \square). El análisis con perMANOVA se muestra bajo la figura, obtenido con el paquete *vegan-v2.4*.

Cuadro 4. Efecto de la aplicación de amonio (suelo sin adición y con adición de 300 mg NH₄⁺-N kg⁻¹) sobre la estructura bacteriana a nivel de filos y géneros en el suelo con camas y agricultura convencional (CT) o camas permanentes con quema de residuos (PBB) o camas permanentes con retención de cultivos (PBC) empleando análisis de datos composicionales, i.e. análisis de abundancia diferencial con *aldex.kw* en la paquetería ALDEx2 (Gloor et al. 2019).

CT		PBB		PBC	
TM6	1.50×10 ⁻³ ^b	Proteobacteria	2.41×10 ⁻²	TM6	1.53×10 ⁻²
Armatimonadetes	1.97×10 ⁻³	TM6	3.18×10 ⁻²	Elusimicrobia	2.31×10 ⁻²
Firmicutes	2.56×10 ⁻³	Firmicutes	3.19×10 ⁻²	Proteobacteria	2.35×10 ⁻²
Elusimicrobia	4.31×10 ⁻³	Gemmatimonadetes	4.01×10 ⁻²	TM7	3.13×10 ⁻²
Gemmatimonadetes	7.37×10 ⁻³			Armatimonadetes	3.98×10 ⁻²
Acidobacteria	1.13×10 ⁻²			Firmicutes	4.41×10 ⁻²
Proteobacteria	1.74×10 ⁻²				
Fibrobacteres	3.93×10 ⁻²				
Bacteroidetes	4.37×10 ⁻²				
<i>Bacillus</i>	3.97×10 ⁻⁵	<i>Pseudomonas</i>	7.25×10 ⁻⁷	<i>Pseudomonas</i>	5.41×10 ⁻⁴
<i>Ammoniphilus</i>	8.34×10 ⁻⁵	<i>Ammoniphilus</i>	3.83×10 ⁻⁵	<i>Enterobacter</i>	3.19×10 ⁻³
<i>Steroidobacter</i>	8.64×10 ⁻⁵	<i>Stenotrophomonas</i>	5.24×10 ⁻⁴	<i>Clostridium</i>	3.32×10 ⁻³
<i>Paenibacillus</i>	1.39×10 ⁻⁴	<i>Bacillus</i>	5.30×10 ⁻⁴	<i>Bacillus</i>	3.61×10 ⁻³
<i>Enterobacter</i>	3.22×10 ⁻⁴	<i>Paenibacillus</i>	6.29×10 ⁻⁴	<i>Steroidobacter</i>	1.79×10 ⁻²
<i>Candidatus Solibacter</i>	4.13×10 ⁻⁴	<i>Clostridium</i>	1.21×10 ⁻³	<i>Opitutus</i>	2.09×10 ⁻²
<i>Fimbriimonas</i>	5.67×10 ⁻⁴			<i>Paenibacillus</i>	2.38×10 ⁻²
<i>Rubrivivax</i>	5.85×10 ⁻⁴			<i>Methylibium</i>	2.57×10 ⁻²
<i>Pseudomonas</i>	6.14×10 ⁻⁴			<i>Balneimonas</i>	4.64×10 ⁻²
<i>Candidatus Koribacter</i>	1.21×10 ⁻³			<i>Stenotrophomonas</i>	4.65×10 ⁻²
<i>Rhodoplanes</i>	1.32×10 ⁻³			<i>Ramlibacter</i>	4.80×10 ⁻²
<i>Balneimonas</i>	1.42×10 ⁻³				
<i>Clostridium</i>	1.88×10 ⁻³				
<i>Stenotrophomonas</i>	2.58×10 ⁻³				
<i>Lysobacter</i>	3.51×10 ⁻³				
<i>Rubellimicrobium</i>	5.10×10 ⁻³				
<i>Methylibium</i>	5.27×10 ⁻³				
<i>Ramlibacter</i>	6.63×10 ⁻³				
<i>Azoarcus</i>	9.69×10 ⁻³				
<i>Phenylobacterium</i>	1.43×10 ⁻²				

^a Se muestran sólo los grupos bacterianos a nivel de filo y género significativamente afectados por la aplicación de amonio ($P < 0.05$), con los valores P más bajos, ^b valores P obtenidos mediante el test de Kruskal-Wallis sobre cada grupo bacteriano obtenido con la función *aldex.kw* sobre los datos convertidos a clr (centered log ratio transformation) empleando la paquetería ALDEx2.

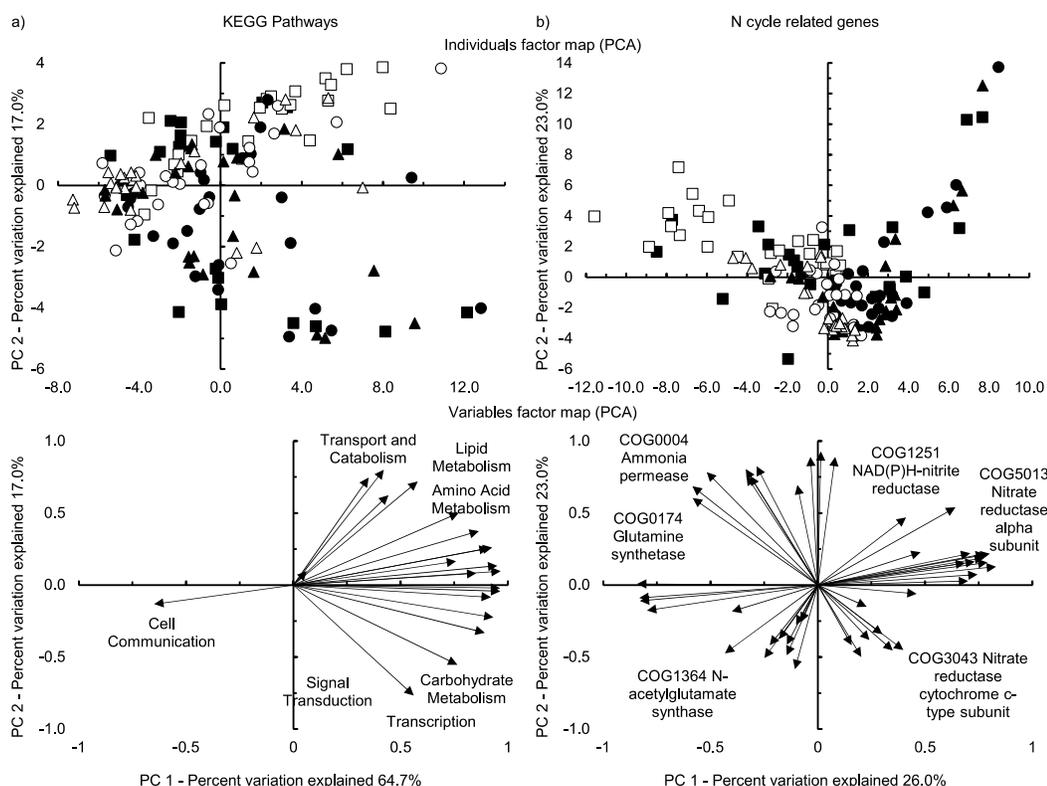


Figura 24. Análisis de componentes principales del efecto de las prácticas agrícolas y adición de NH_4^+ sobre a) las rutas metabólicas (KEGG nivel 2), y b) genes putativos del ciclo de N.

7.4. Discusión

7.4.1. Mineralización de C y N

La incorporación de residuos orgánicos incrementa la emisión de CO_2 dado que el material orgánico está expuesto a la degradación directa de los microorganismos. La labranza rompe lo agregados, lo que a su vez libera material orgánico antes protegido y que ahora se expone a su degradación; así la labranza también puede incrementar la emisión de CO_2 . Sin embargo, en este estudio, la liberación de CO_2 fue similar entre los tratamientos con práctica convencional y de conservación.

Los suelos empleados en este estudio –CT, PBB y PBC– poseían bajo contenido de N mineral, ya que la aplicación de 300 mg NH_4^+ incrementó al doble la emisión de CO_2 ,

independientemente de la práctica agrícola. Si bien la cantidad de C disponible para el metabolismo heterotrófico fue elevada, la limitación de N pudo haber disminuido su degradación. El suelo empleado en este estudio carece de N ya que ha permanecido sin fertilización por casi 30 años, además, los residuos de cultivos de maíz y trigo se caracterizan por una elevada proporción C/N. Es por lo que la aplicación de N mineral incrementó y aceleró la descomposición del material orgánico.

Aun cuando se aplicó una cantidad considerable de NH_4^+ (300 mg kg^{-1}), gran parte de este no se detectó tras 14 días de experimentación; lo anterior podría explicarse por la inmovilización de N y/o por la oxidación de amonio mediante nitrificadores. La falta de N mineral en el suelo fue evidente ya que $>100 \text{ mg}$ de N no fue detectado tras 14-28 días de experimentación en forma de NO_3^- .

7.4.2. Diversidad bacteriana del suelo

El efecto de las prácticas agrícolas y el manejo de residuos sobre la diversidad bacteriana del suelo está sinérgicamente relacionado a variables edáficas y ambientales, así como a la dinámica de nutrientes en el suelo (Guo et al. 2016a; Zhou et al. 2017). En estudios previos se ha observado que la riqueza de especies bacterianas es mayor cuando el suelo está sujeto a cero-labranza comparado con labranza convencional (Wang et al. 2016). Sin embargo, otros han mostrado poco o nulo efecto de la labranza sobre la riqueza y diversidad bacterianos (Navarro-Noya et al. 2013; Smith et al. 2016). En este estudio, las prácticas agrícolas no mostraron tener efecto sobre la diversidad y riqueza bacterianos.

Por otro lado, la aplicación de fertilizantes nitrogenados también puede afectar la diversidad bacteriana, pero su efecto varía dependiendo del tipo de suelo y de la cantidad de fertilizante empleado (Zhou et al. 2017; Dai et al. 2018). Por ejemplo, los resultados de Staley

[et al. \(2018\)](#) mostraron que los cambios en la diversidad bacteriana ocurrieron en suelos fertilizados con tasas elevadas de urea: 500 mg urea-N kg⁻¹, además, el efecto dependió de las características del suelo. El estudio de [Staley et al. \(2018\)](#) se basó en el análisis de 8 suelos de cultivo, y tres niveles de fertilización. Contrastando, los resultados de [Fierer et al. \(2012\)](#) mostraron que la diversidad bacteriana no es afectada por la fertilización de N a diferentes niveles. Nuestros resultados contrastan con [Fierer et al. \(2012\)](#), ya que la aplicación de NH₄⁺ incrementó la riqueza y diversidad de especies bacterianas del suelo.

7.4.3. Efecto de las prácticas y aplicación de amonio sobre la estructura bacteriana del suelo

Las prácticas agrícolas, como el manejo de residuos y labranza, afectan la estructura bacteriana del suelo ([Navarro-Noya et al. 2013](#); [Jiménez-Bueno et al. 2016](#)). El manejo y la composición química de los residuos orgánicos dejados en la superficie del suelo en campo también define el efecto sobre las poblaciones bacteriana ([Fernández et al. 2016](#)). Retener residuos provee de C a los microorganismos heterótrofos; y sus características como el contenido de lignina y hemicelulosa, así como la proporción C/N determina su disponibilidad, y a su vez define qué grupos son afectados positivamente.

[Kraut-Cohen et al. \(2020\)](#) observaron que inclusive un solo evento de arado de suelo afecta significativamente a ciertos grupos microbianos. El arado expone los residuos orgánicos a los microorganismos del suelo, y rompe los agregados liberando la materia orgánica antes protegida ([Guo et al. 2016b](#)). Los cambios en la disponibilidad y contenido de material orgánico provocarán el enriquecimiento de ciertos grupos, y disminuirá la de otros ([Ouyang and Norton, 2020](#)).

Por otro lado, se han reportado poco o nulo efecto de la aplicación de nitrógeno a corto y largo plazo ([Li et al. 2017](#); [Ouyang and Norton, 2020](#)). Sin embargo, los resultados en este

estudio mostraron que la comunidad bacteriana fue afectada de forma significativa por la aplicación de amonio. Los residuos retenidos en campo en los suelos de este estudio, que se caracterizan por la alta relación de C/N, enriquecieron a ciertos grupos como *Bacillus*, mientras la aplicación de amonio a otros como *Rheinheimera* y *Acinetobacter*. La aplicación de amonio en el laboratorio proveyó de N mineral a la comunidad bacteriana para la mineralización de grandes cantidades de C producto de la retención de residuos de cultivos por más de 30 años. Como resultado, la estructura microbiana sufrió cambios casi inmediatos tras la aplicación de amonio al suelo comparado con el suelo sin adición de este. Tras 5 a 7 días de experimento, la comunidad bacteriana en el suelo con adición de amonio fue similar a la del suelo sin adición de amonio. Además, la aplicación de amonio estimuló el crecimiento de varios grupos bacterianos; entre ellos algunos conocidos por ser abundantes en la rizósfera o endófitos –grupos bacterianos identificados dentro de las plantas con propiedades benéficas para esta (Afzal et al. 2019)–, con estilo copiotrófico –aquellos enriquecidos en ambientes con alto contenido de C disponible y fácilmente asimilable (Fierer et al. 2007)–. Miembros pertenecientes a *Flavisolibacter* y *Pseudomonas* respondieron positivamente enriqueciéndose tras la aplicación de amonio. Grupos relacionados al proceso de nitrificación fueron afectados por la aplicación de amonio; miembros de *Nitrospira* y *Nitrosovibrio* respondieron positivamente a la aplicación de amonio, siendo enriquecidos.

7.4.4. Predicción funcional: metagenoma del suelo

Los cambios en el contenido y disponibilidad de la materia orgánica alteran la estructura microbiana del suelo. Los cambios en la población bacteriana pueden también cambiar la funcionalidad potencial del suelo (Wagg et al. 2014; Sengupta et al. 2020). La retención de residuos de cultivo, y el arado de suelo cambia el contenido de C disponible para los

microorganismos, y esto a su vez, afecta la actividad enzimática y diversidad funcional (Schmitd et al. 2018; Sengupta et al. 2020). Se ha observado que la reducción de labranza o cero-labranza, junto a la retención de cultivos, incrementa la actividad enzimática-microbiana relacionado con la degradación de compuestos de C, por ejemplo, la degradación de carbohidratos y compuestos fenólicos, y el metabolismo de urea. Lo anterior comparado con el arado convencional con o sin retención de residuos de cultivos (Margenot et al. 2017; Nivelles et al. 2016). En este estudio, las funciones metabólicas relacionados a la degradación de compuestos complejos de C y el metabolismo de compuestos nitrogenados (rutas de asimilación y transporte) fueron enriquecidos debido a las prácticas agrícolas, y en menor grado, por la aplicación de amonio.

La aplicación de nitrógeno puede afectar los genes relacionados, por ejemplo, con el ciclo del nitrógeno. Li et al (2020) observaron el enriquecimiento del metabolismo de compuestos orgánicos de nitrógeno, y el metabolismo bacteriano de compuestos nitrogenados, e.g. nitrificación, desnitrificación y reducción asimilatoria de nitrato, en experimentos de larga duración en suelos fertilizados. Por otro lado, Chèneby et al. (2010) observaron el enriquecimiento de microorganismos reductores de nitrato como resultado de la aplicación de residuos de cultivos, por ejemplo, residuos de trigo, como los empleados en los suelos de este estudio. El efecto sinérgico de factores edáficos, cero labranza y retención de material con alto contenido orgánico como lo son los residuos de cultivos afectará de diferente forma a la cadena trófica de los grupos bacterianos del suelo.

7.5. Conclusión

Se determinó la estructura, diversidad y funcionalidad de la comunidad bacteriana en un suelo de cultivo bajo dos sistemas de cultivo (camas permanentes con arado convencional y camas permanentes sin arado) con retención ó quema de residuos de cultivos (maíz y trigo).

Independientemente de la práctica agrícola (CT, PBB o PBC) la aplicación de amonio incrementó el CO₂ emitido al doble. La falta de nitrógeno en el suelo fue evidente al observar el decremento en el contenido de amonio del suelo de manera muy rápida en los primeros días de la dinámica. La determinación de nitrito y nitrato puede interpretarse como evidencia del proceso de nitrificación. Sin embargo, cerca de 100 mg de NH₄⁺-N no fue determinado al final del experimento, lo que podría indicar inmovilización de N. Lo anterior dado la falta de nitrógeno y alto contenido de C en el suelo.

La estructura bacteriana estuvo definida por la aplicación de amonio que por las prácticas agrícolas aplicadas. La aplicación de éste tuvo un efecto inmediato sobre la población microbiana del suelo, y se diferenció de los suelos sin adición de amonio durante los primeros 0 a 5 días del experimento. Grupos microbianos con estilo metabólico copiotrófico e identificados como endófitos o rizósfericos fueron enriquecidos por la aplicación de amonio, por ejemplo, *Flavisolibacter*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, entre otros. Los cambios en la estructura bacteriana evidenciaron también cambios en la funcionalidad. Las rutas y genes relacionados con la mineralización de C y N fueron afectados por la aplicación de amonio, y en menor grado por las prácticas agrícolas.

8. Referencias

- Adriaenssens, E.M., Kramer, R., Van Goethem, M.W., Makhallanyane, T.P., Hogg, I., Cowan, D.A., 2017. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. *Microbiome* 5, 83. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0301-7>
- Afzal, I., Shinwai, Z.K., Sikandar S., Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221: 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Akita H, Matsushika A, Kimura ZI. *Enterobacter oligotrophica* sp. nov., a novel oligotroph isolated from leaf soil. *Microbiologyopen*. 2019 Sep;8(9):e00843. doi: 10.1002/mbo3.843.
- Alonso-Ayuso, M., Gabriel, J.L., Quemada, M., 2016. Nitrogen use efficiency and residual effect of fertilizers with nitrification inhibitors. *European Journal of Agronomy* 80, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2016.06.008>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson IC, Levine JS. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51(5):938-945. PMID: 16347068.
- Aronesty, E. (2013). Comparison of Sequencing Utility Programs. *The Open Bioinformatics Journal*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.2174/1875036201307010001>
- Arsenault, C., 2017. Only 60 Years of farming left if soil degradation continues. *American Scientific*.
- 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, 11146. <https://doi.org/10.1038/srep11146>
- Beeckman F, Motte H, Beeckman T. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;50:166-173. doi:10.1016/j.copbio.2018.01.014
- Berendsen, R.L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., de Jonge, R., Burgman, W.P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 2018. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME J.* 12, 1496-1507. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0093-1>
- Bergmann, D.J., Hooper, A.B., Klotz, M.G., 2005. Structure and Sequence Conservation of hao Cluster Genes of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria: Evidence for Their Evolutionary History. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5371-5382. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5371-5382.2005>
- Berlemont, R., Martiny, A.C., 2013. Phylogenetic distribution of potential cellulases in Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1545-1554. <https://doi.org/10.1128/AEM.03305-12>
- Birch, H.F., 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant Soil* 10: 9-31. <https://doi.org/10.1007/BF01343734>
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 67, 192-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>
- Blum, W.E.H., 2013. Soil and land resource for agricultural production: General trends and future scenarios - A worldwide perspective. *International Soil and Water Conservation Research* 1, 1-14.
- Breullin-Sessoms, F., Venterea, R.T., Sadowsky, M.J., Coulter, J.A., Clough, T.J., Wang, P., 2017. Nitrification gene ratio and free ammonia explain nitrite and nitrous oxide production in urea-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 143-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.04.007>
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods.* 12, 59-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Bushnell, B., 2014. Introducing RemoveHuman: human contaminant removal. URL <https://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=42552> (accessed August 2019).
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carbonetto, B., Rascovan, N., Álvarez, R., Mentaberry, A., Vázquez, M.P., 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *PLoS One* 9, e99949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099949>
- Cederlund, H., Wessén, E., Enwall, K., Jones, C.M., Juhanson, J., Pell, M., Philippot, L., Hallin, S., 2014. Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Appl. Soil Ecol.* 84:62-68. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.06.003>

- Chahal I, Vyn RJ, Mayers D, Van Eerd LL. Cumulative impact of cover crops on soil carbon sequestration and profitability in a temperate humid climate. *Scientific Reports*. 2020;10(1):13381. doi:10.1038/s41598-020-70224-6
- Chakraborty P, Sarker RK, Roy R, Ghosh A, Maiti D, Tribedi P. (2019). Bioaugmentation of soil with *Enterobacter cloacae* AKS7 enhances soil nitrogen content and boosts soil microbial functional-diversity. *3 Biotech*. 2019 Jul;9(7):253. doi: 10.1007/s13205-019-1791-8.
- Chao A., Chiu CH., Jost L. (2016) Phylogenetic diversity measures and their decomposition: A framework based on Hill numbers. In: Pellens R., Grandcolas P. (eds) *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics*. Topics in Biodiversity and Conservation, vol 14. Springer, Cham. doi. 10.1007/978-3-319-22461-9_8
- Chávez-Romero, Y., Navarro-Noya, Y.E., Reynoso-Martínez, S.C., Sarria-Guzmán, Y., Govaerts, B., Verhulst, N., Dendooven, L., Luna-Guido, M., 2016. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil Tillage Res.* 159, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.007>
- Chávez-Romero, Y., Navarro-Noya, Y.E., Reynoso-Martínez, S.C., Sarria-Guzmán, Y., Govaerts, B., Verhulst, N., Dendooven, L., Luna-Guido, M., 2016. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. *Soil and Tillage Research* 159, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.007>
- Chêneby, D., Bru, D., Pascault, N., Maron, P.A., Ranjard, L., Philippot, L., 2010. Role of Plant Residues in Determining Temporal Patterns of the Activity, Size, and Structure of Nitrate Reducer Communities in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7136–7143. <https://doi.org/10.1128/AEM.01497-10>
- Choudhary, M., Sharma, P.C., Jat, H.S., Nehra, V., McDonald, A.J., Garg, N., 2016. Crop residue degradation by fungi isolated from conservation agriculture fields under rice–wheat system of North-West India. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 5, 349-360. <https://doi.org/10.1007/s40093-016-0145-3>
- Cookson, W.R., Beare, M.H., Wilson, P.E. 1998 Effects of prior crop residue management on microbial properties and crop residue decomposition *Applied Soil Ecology*, 7, 179-188. doi: 10.1016/S0929-1393(97)00032-2
- Cordero J, de Freitas JR, Germida JJ. Bacterial microbiome associated with the rhizosphere and root interior of crops in Saskatchewan, Canada. *Can J Microbiol.* 2020 Jan;66(1):71-85. doi: 10.1139/cjm-2019-0330.
- Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ. How Plant Root Exudates Shape the Nitrogen Cycle. *Trends in Plant Science*. 2017;22(8):661-673. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.004>
- Coskun, D., Britto, D.T., Shi, W., Kronzucker, H.J., 2017. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants* 3, 1-10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.74>
- Dai, Z., Su, W., Chen, H., Barberán, A., Zhao, H., Yu, M., Yu, L., Brookes, P.C., Schadt, C.W., Chang, S.X., Xu, J. (2018). Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. *Global Change Biology* 24, 3452-3461. <https://doi.org/10.1111/gcb.14163>
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 565-569. <https://doi.org/10.1038/nature16461>
- de Bruijn, I., Cheng, X., de Jager, V., Expósito, R.G., Watrous, J., Patel, N., Postma, J., Dorrestein, P.C., Kobayashi, D., Raaijmakers, J.M., 2015. Comparative genomics and metabolic profiling of the genus *Lysobacter*. *BMC Genomics* 16, 991. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2191-z>
- de la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M., Stahl, D.A., 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10, 810-818. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01506.x>
- de Mendiburu, F. (2020). *agricolae*: Statistical procedures for agricultural research. R package version 1.3-2. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- Dendooven, L., Gutiérrez-Oliva, V.F., Patiño-Zúñiga, L., Ramírez-Villanueva, D.A., Verhulst, N., Luna-Guido, M., Marsch, R., Montes-Molina, J., Gutiérrez-Miceli, F.A., Vásquez-Murrieta, S., Govaerts, B., 2012. Greenhouse gas emissions under conservation agriculture compared to traditional cultivation of maize in the central highlands of Mexico. *Science of The Total Environment* 431, 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.029>
- Dethier, J.-J., Effenberger, A., 2012. Agriculture and development: A brief review of the literature. *Economic Systems* 36, 175-205. <https://doi.org/10.1016/j.ecosys.2011.09.003>
- Diamond, S., Andeer, P.F., Li, Z., Crits-Christoph, A., Burstein, D., Anantharaman, K., Lane, K.R., Thomas, B.C., Pan, C., Northen, T.R., Banfield, J.F., 2019. Mediterranean grassland soil C–N compound turnover is dependent on rainfall and depth, and is mediated by genomically divergent microorganisms. *Nat. Microbiol.*

- 4, 1356-1367. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0449-y>
- Dong CJ, Wang LL, Li Q, Shang QM. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One*. 2019 Nov 8;14(11):e0223847. doi:10.1371/journal.pone.0223847
- Emerson, J.B., Roux, S., Brum, J.R. et al. 2018. Host-linked soil viral ecology along a permafrost thaw gradient. *Nat. Microbiol.* 3, 870-880. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0190-y>
- Erismann, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* 1, 636-639. <https://doi.org/10.1038/ngeo325>
- Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F., 2008. The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles. *Science* 320, 1034–1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- FAO, 2009. FAO's Director-General on How to Feed the World in 2050. *Population and Development Review* 35, 837-839. <https://doi.org/10.1111/j.1728-4457.2009.00312.x>
- FAO, 2015. World fertilizer trends and outlook to 2018. Food and Agriculture Organization.
- FAO, 2017. Crop Prospects and Food Situation. Food and Agriculture Organization.
- Fenchel, T., 1986. The ecology of heterotrophic microflagellates. In: Marshall K.C., (Ed.), *Adv Microb Ecol.* Springer, Boston, pp. 57-97. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_2
- Fernandes AD, Reid JN, Macklaim JM, McMurrough TA, Edgell DR, Gloor GB. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome*. 2014;2(1):15. doi:10.1186/2049-2618-2-15
- Fernandes, A.D., Reid, J.N.S., Macklaim, J.M., McMurrough, T.A., Edgell, D.R., Gloor, G.B., 2014. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: Characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2, 15. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-15>
- Fernandez AL, Sheaffer CC, Wyse DL, Staley C, Gould TJ, Sadowsky MJ. Structure of bacterial communities in soil following cover crop and organic fertilizer incorporation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(21):9331-9341. doi: 10.1007/s00253-016-7736-9.
- Fiencke C, Bock E. Genera-specific immunofluorescence labeling of ammonia oxidizers with polyclonal antibodies recognizing both subunits of the ammonia monooxygenase. *Microb Ecol.* 2004 May;47(4):374-84. doi: 10.1007/s00248-003-1009-8. Epub 2004 Mar 4. PMID: 14994172.
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 579-590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007a. Toward an ecological classification of soil Bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364. <https://doi.org/10.1890/05-1839>
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R.A., Felts, B., Rayhawk, S., Knight, R., Rohwer, F., Jackson, R.B., 2007b. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7059-7066. <https://doi.org/10.1128/AEM.00358-07>
- 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. *The ISME Journal* 6, 1007-1017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.159>
- Fiore-Donno, A.M., Richter-Heitmann, T., Degrune, F., Dumack, K., Regan, K.M., Marhan, S., Boeddinghaus, R.S., Rillig, M.C., Friedrich, M.W., Kandeler, E., Bonkowski, M., 2019. Functional traits and spatio-temporal structure of a major group of soil protists (Rhizaria: Cercozoa) in a temperate grassland. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01332>
- Flårdh, K., Buttner, M.J., 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36-49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M., 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Fraç, M., Hannula, S.E., Bełka, M., Jędryczka, M., 2018. Fungal biodiversity and their role in soil health. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- Geisen, S., Mitchell, E.A.D., Adl, S., Bonkowski, M., Dunthorn, M., Ekelund, F., Fernández, L.D., Jousset, A., Krashevskaya, V., Singer, D., Spiegel, F.W., Walochnik, J., Lara, E., 2018. Soil protists: a fertile frontier in soil biology research. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 293-323. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy006>
- Geisseler, D., Scow, K.M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>
- Geisseler, D., Scow, K.M., 2014. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023>

- Gloor, G.B., Macklaim, J.M., Pawlowsky-Glahn, V., Egozcue, J.J., 2017. Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. *Front. Microbiol.* 8, 2224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>
- Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237–264. <https://doi.org/10.1093/biomet/40.3-4.237>
- Gómez-Acata, S., Vital-Jácome, M., Pérez-Sandoval, M.V., Navarro-Noya, Y.E., Thalasso, F., Luna-Guido, M., Conde-Barajas, E., Dendooven, L., 2018. Microbial community structure in aerobic and fluffy granules formed in a sequencing batch reactor supplied with 4-chlorophenol at different settling times. *J. Hazard. Mater.* 342, 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.073>
- Govaerts, B., Sayre, K.D., Ceballos-Ramirez, J.M. et al. 2006. Conventionally tilled and permanent raised beds with different crop residue management: Effects on soil C and N dynamics. *Plant Soil* 280, 143–155. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-2854-7>
- Govaerts, B., Verhulst, N., Castellanos-Navarrete, A., Sayre, K.D., Dixon, J., Dendooven, L., 2009. Conservation Agriculture and Soil Carbon Sequestration: Between Myth and Farmer Reality. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28, 97–122. <https://doi.org/10.1080/07352680902776358>
- Graham, E.B., Paez-Espino, D., Brislawn, C., Neches, R. Y., Hofmockel, K.S., Wu, R., Kyrpides, N.C., Jansson, J.K., McDermott, J.E., 2019. Untapped viral diversity in global soil metagenomes. *bioRxiv* 583997. <https://doi.org/10.1101/583997>
- Grossmann, L., Jensen, M., Heider, D., Jost, S., Glücksman, E., Hartikainen, H., Mahamdallie, S.S., Gardner, M., Hoffmann, D., Bass, D., Boenigk, J., 2016. Protistan community analysis: Key findings of a large-scale molecular sampling. *ISME J.* 10, 2269–2279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.10>
- Grujic, V., Nuy, J.K., Salcher, M.M., Shabarova, T., Kasalicky, V., Boenigk, J., Jensen, M., Simek, K., 2018. Cryptophyta as major bacterivores in freshwater summer plankton. *ISME J.* 12, 1668–1681. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0057-5>
- Guo LJ, Lin S, Liu TQ, Cao CG, Li CF. Effects of conservation tillage on topsoil microbial metabolic characteristics and organic carbon within aggregates under a rice (*Oryza sativa* L.)-Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cropping System in Central China. *PLoS One.* (2016b);11(1):e0146145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146145>.
- Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Ma, B., Ge, S., Wang, Z., Huang, H., Zhang, J., Zhang, L., 2013. Pathways and Organisms Involved in Ammonia Oxidation and Nitrous Oxide Emission. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43, 2213–2296. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.672072>
- Guo, L., Zheng, S., Cao, C., Li, C. (2016a). Tillage practices and straw-returning methods affect topsoil bacterial community and organic C under a rice-wheat cropping system in central China. *Scientific Reports* 6, 33155. <https://doi.org/10.1038/srep33155>
- Guo, Y., Chen, X., Wu, Y., Zhang, L., Cheng, J., Wei, G., et al. 2018. Natural revegetation of a semiarid habitat alters taxonomic and functional diversity of soil microbial communities. *Sci. Total Environ.* 635, 598–606. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.171
- Haddaway, N.R., Hedlund, K., Jackson, L.E. et al. How does tillage intensity affect soil organic carbon? A systematic review. *Environ Evid* 6, 30 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13750-017-0108-9>
- Hartmann, M., Widmer, F., 2006. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7804–7812. <https://doi.org/10.1128/AEM.01464-06>
- Hatzenpichler, R., 2012. Diversity, Physiology, and Niche Differentiation of Ammonia-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7501–7510. <https://doi.org/10.1128/AEM.01960-12>
- He, H., Li, M., Zhen, Y., Mi, T., Yu, Z., 2020. Bacterial and archaeal communities in sediments from the adjacent waters of Rushan Bay (China) revealed by Illumina sequencing. *Geomicrobiol. J.* 37, 86–100. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1666193>
- He, W., Kim, Y., Ko, D., Yun, S., Jun, S., Yoo, G., 2019. Changes in soil N₂O and CH₄ emissions and related microbial functional groups in an artificial CO₂ gassing experiment. *Sci. Total Environ.* 690, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.400>
- Heffner, R.A., Butler IV, M.J., Reilly, C.K., 1996. Pseudoreplication revisited. *Ecology* 77, 2558–2562. doi: 10.2307/2265754
- Herbert, R.A., 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 23(5):563–590. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00414.x>
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5(10), 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>

- Hoffman, C. S., Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Hofstra, N., Bouwman, A.F., 2005. Denitrification in Agricultural Soils: Summarizing Published Data and Estimating Global Annual Rates. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 72, 267-278. <https://doi.org/10.1007/s10705-005-3109-y>
- Hou L, Jiang J, Xu Z, Zhou Y, Leung FC. Complete genome sequence of *Pseudoxanthomonas suwonensis* Strain J1, a cellulose-degrading bacterium isolated from leaf- and wood-enriched soil. *Genome Announc.* 2015; 3(3):e00614-15. doi: 10.1128/genomeA.00614-15
- Huang, M., Hull, C.M., 2017. Sporulation: how to survive on planet Earth (and beyond). *Curr. Genet.* 63, 831-838. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0694-7>
- Huson, D.H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., Tappu, R., 2016. MEGAN community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>
- Janssen, P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719-1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Jenkinson, D. S., Powlson, D. S. (1976). The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. *Soil Biology and Biochemistry*, 8(3), 209-213. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90005-5)
- Jha PN, Gomaa AB, Yanni YG, El-Saadany AY, Stedtfeld TM, Stedtfeld RD, Gantner S, Chai B, Cole J, Hashsham SA, Dazzo FB. (2020) Alterations in the endophyte-enriched root-Associated microbiome of Rice Receiving Growth-Promoting Treatments of Urea Fertilizer and Rhizobium Biofertilizer. *Microb Ecol.* 2020 Feb;79(2):367-382. doi: 10.1007/s00248-019-01406-7
- Jia, T., Wang, R., Fan, X., Chai, B., 2018. A comparative study of fungal community structure, diversity and richness between the soil and the phyllosphere of native grass species in a copper tailings dam in Shanxi province, China. *Appl. Sci.* 8, 1297. <https://doi.org/10.3390/app8081297>
- Jiménez-Bueno, N.G., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Ortiz-Gutiérrez, D., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., Navarro-Noya, Y.E., 2016. Bacterial indicator taxa in soils under different long-term agricultural management. *J. Appl. Microbiol.* 120, 921-933. <https://doi.org/10.1111/jam.13072>
- Jiménez-Bueno, N.G., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Ortiz-Gutiérrez, D., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., Navarro-Noya, Y.E., 2016. Bacterial indicator taxa in soils under different long-term agricultural management. *Journal of Applied Microbiology* 120, 921-933. <https://doi.org/10.1111/jam.13072>
- Joshi, N., Fass, J., 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33). URL <https://github.com/najoshi/sickle> (accessed August, 2020)
- Junier, P., Kim, O.-S., Junier, T., Ahn, T.-S., Imhoff, J.F., Witzel, K.-P., 2009. Community analysis of betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria using the amoCAB operon. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 175-188. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1923-x>
- Junier, P., Molina, V., Dorador, C., Hadas, O., Kim, O.-S., Junier, T., Witzel, K.-P., Imhoff, J.F., 2010. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 425-440. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2228-9>
- Kämpfer, P., 2015. *Streptomyces*, In: Trujillo, M.E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey F.A., Whitman, W.B., (Eds.), *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1-414. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00191>
- Kandemir, T., Schuster, M.E., Senyshyn, A., Behrens, M., Schlögl, R., 2013. The Haber-Bosch Process Revisited: On the Real Structure and Stability of “Ammonia Iron” under Working Conditions. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 12723-12726. <https://doi.org/10.1002/anie.201305812>
- Keiluweit, M., Wanzek, T., Kleber, M., Nico, P., Fendorf, S., 2017. Anaerobic microsites have an unaccounted role in soil carbon stabilization. *Nat. Commun.* 8, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01406-6>
- Kielak, A., Pijl, A.S., van Veen, J.A., Kowalchuk, G.A., 2009. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *ISME J.* 3, 378-382. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.113>
- Klaubauf, S., Inselsbacher, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Wanek, W., Gottsberger, R., Strauss, J., Gorfer, M., 2010. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers.* 44, 65-75. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0053-1>
- Knops, J.M.H., Tilman, D., 2000. Dynamics of soil nitrogen and carbon accumulation for 61 years after agricultural abandonment. *Ecology* 81, 88-98. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[0088:DOSNAC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[0088:DOSNAC]2.0.CO;2)
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543-546. <https://doi.org/10.1038/nature03911>
- Koranda M, Kaiser C, Fuchslueger L, et al. Fungal and bacterial utilization of organic substrates depends on substrate complexity and N availability. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014;87(1):142-152. doi:10.1111/1574-6941.12214
- Kraut-Cohen J, Zolti A, Shaltiel-Harpaz L, Argaman E, Rabinovich R, Green SJ, Minz D. Effects of tillage practices on soil microbiome and agricultural parameters. *Sci Total Environ.* 2020 Feb 25;705:135791. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135791.
- Kumar V, Chandra R. (2020) Metagenomics analysis of rhizospheric bacterial communities of *Saccharum arundinaceum* growing on organometallic sludge of sugarcane molasses-based distillery. *3 Biotech.* 2020 Jul;10(7):316. doi: 10.1007/s13205-020-02310-5.
- Kuzyakov, Y., Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 184-199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025>
- Ladha, J.K., Pathak, H., J. Krupnik, T., Six, J., van Kessel, C., 2005. Efficiency of Fertilizer Nitrogen in Cereal Production: Retrospects and Prospects. pp. 85-156. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)87003-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)87003-8)
- Lal, R., 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304, 1623-1627. <https://doi.org/10.1126/science.1097396>
- Lamba, S., Bera, S., Rashid, M., Medvinsky, A.B., Sun, G.-Q., Acquisti, C., Chakraborty, A., Li, B.-L., 2017. Organization of biogeochemical nitrogen pathways with switch-like adjustment in fluctuating soil redox conditions. *R. Soc. open sci.* 4, 160768. <https://doi.org/10.1098/rsos.160768>
- Langille, M., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J., ... Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814-821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>
- Le Roux, X., Bouskill, N.J., Niboyet, A., Barthes, L., Dijkstra, P., Field, C.B., Hungate, B.A., Lerondelle, C., Pommier, T., Tang, J., Terada, A., Tourna, M., Poly, F., 2016. Predicting the responses of soil nitrite-oxidizers to multi-factorial global change: A trait-based approach. *Front. Microbiol.* 7, 628. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00628>
- Le, S., Josse, J., Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Le, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Leff, J.W., Jones, S.E., Prober, S.M., Barberán, A., Borer, E.T., Firn, J.L., Harpole, W.S., Hobbie, S.E., Hofmockel, K.S., Knops, J.M.H., McCulley, R.L., La Pierre, K., Risch, A.C., Seabloom, E.W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C.J., Fierer, N., 2015. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10967-10972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508382112>
- Li F, Chen L, Zhang J, Yin J, Huang S. Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Front Microbiol.* 2017 Feb 9;8:187. doi: 10.3389/fmicb.2017.00187.
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.-W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31, 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Li, X., Rui, J., Xiong, J., Li, J., He, Z., Zhou, J., Yannarell, A.C., Mackie, R.I., (2014). Functional potential of soil microbial communities in the maize rhizosphere. *PLoS One.* 2014; 9(11): e112609. doi: 10.1371/journal.pone.0112609
- Li, Y.-Y., Chen, X.-H., Xie, Z.-X., Li, D.-X., Wu, P.-F., Kong, L.-F., Lin, L., Kao, S.-J., Wang, D.-Z., (2018). Bacterial Diversity and Nitrogen Utilization Strategies in the Upper Layer of the Northwestern Pacific Ocean. *Front. Microbiol.* 9, 797. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00797>
- Li, Y., Tremblay, J., Bainard, L.D., Cade-Menun, B., Hamel, C., (2020). Long-term effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil microbial community structure and function under continuous wheat production. *Environmental Microbiology* 22, 1066–1088. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14824>
- Lian, T., Yu, Z., Li, Y., Jin, J., Wang, G., Liu, X., Tang, C., Franks, A., Liu, Junjie, Liu, J., 2019. The shift of bacterial community composition magnifies over time in response to different sources of soybean residues. *Appl. Soil Ecol.* 136, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.001>

- Liang B, Ma C, Fan L, Wang Y, Yuan Y. (2018) Soil amendment alters soil physicochemical properties and bacterial community structure of a replanted apple orchard. *Microbiol Res.* 216:1-11. doi: 10.1016/j.micres.2018.07.010.
- Limon-Ortega, A., Govaerts, B., Deckers, J., Sayre, K.D., 2006. Soil aggregate and microbial biomass in a permanent bed wheat–maize planting system after 12 years. *Field Crops Research* 97, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.11.001>
- Limon-Ortega, A., Sayre, K.D., Francis, C.A., 2000. Wheat nitrogen use efficiency in a bed planting system in northwest Mexico. *Agron. J.*, 92:303-308. <https://doi.org/10.2134/agronj2000.922303x>
- Limon-Ortega, A., Sayre, K.D., Francis, C.A., 2000. Wheat and maize yields in response to straw management and nitrogen under a bed planting system. *Agronomy Journal* 92, 295-302. <https://doi.org/10.2134/agronj2000.922295x>
- Lin, H., Liu, C., Li, B., Dong, Y. (2021). *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. 402:123829. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123829
- Linquist, B.A., Liu, L., van Kessel, C., van Groenigen, K.J., 2013. Enhanced efficiency nitrogen fertilizers for rice systems: Meta-analysis of yield and nitrogen uptake. *Field Crops Research* 154, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.08.014>
- Liu, D., Keiblinger, K.M., Leitner, S., Wegner, U., Zimmermann, M., Fuchs, S., Lassek, C., Riedel, K., Zechmeister-Boltenstern, S., 2019. Response of microbial communities and their metabolic functions to drying–rewetting stress in a temperate forest soil. *Microorganisms* 7, 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050129>
- Liu, J., You, L., Amini, M., Obersteiner, M., Herrero, M., Zehnder, A.J.B., Yang, H., 2010. A high-resolution assessment on global nitrogen flows in cropland. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8035-8040. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913658107>
- Lloyd, A.B., 1969. Behaviour of Streptomycetes in Soil. *J. Gen. Microbiol.* 56, 165-170. <https://doi.org/10.1099/00221287-56-2-165>
- Loeffler, C., Karlsberg, A., Martin, L.S., Eskin, E., Koslicki, D., Mangul, S., 2020. Improving the usability and comprehensiveness of microbial databases. *BMC Biol.* 18, 37. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-0756-z>
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P., 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci. Rep.* 6, 25279. <https://doi.org/10.1038/srep25279>
- Löscher, C.R., Kock, A., Köneke, M., LaRoche, J., Bange, H.W., Schmitz, R.A., 2012. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing Archaea. *Biogeosciences* 9, 2419-2429. <https://doi.org/10.5194/bg-9-2419-2012>
- Louca, S., Parfrey, L.W., Doebeli, M., 2016. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353, 1272–1277. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J., Breitwieser, F.P., Thielen, P., Salzberg, S.L., 2017. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput. Sci.* 3, e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>
- Luo, C., Rodriguez-R, L.M., Johnston, E.R., Wu, L., Cheng, L., Xue, K., Tu, Q., Deng, Y., He, Z., Shi, J.Z., Yuan, M.M., Sherry, R.A., Li, D., Luo, Y., Schuur, E.A.G., Chain, P., Tiedje, J.M., Zhou, J., Konstantinidis, K.T., 2014. Soil microbial community responses to a decade of warming as revealed by comparative metagenomics. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1777-1786. <https://doi.org/10.1128/AEM.03712-13>
- Luo, Y.; Iqbal, A.; He, L.; Zhao, Q.; Wei, S.; Ali, I.; Ullah, S.; Yan, B.; Jiang, L. (2020). Long-term no-tillage and straw retention management enhances soil bacterial community diversity and soil properties in southern China. *Agronomy* 2020, 10, 1233. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091233>
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506-577. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002>
- Ma, A., Zhuang, X., Wu, J., Cui, M., Lv, D., Liu, C., Zhuang, G., 2013. Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil. *PLoS One* 8, e66146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066146>
- Ma, Z, Li, L. Measuring metagenome diversity and similarity with Hill numbers. *Mol Ecol Resour.* 2018; 18: 1339-1355. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12923>
- Marco, D., 2014. *Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle: Theory, Methods and Applications*, 1st ed. Caister Academic Press.
- Margenot, A.J., Pulleman, M.M., Sommer, R., Paul, B.K., Parikh, S.J., Jackson, L.E., Fonte, S.J., 2017. Biochemical proxies indicate differences in soil C cycling induced by long-term tillage and residue

- management in a tropical agroecosystem. *Plant Soil* 420, 315–329. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3401-z>
- Maron, P.-A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., Karimi, B., Bernard, L., Dequiedt, S., Terrat, S., Chabbi, A., Ranjard, L., 2018. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02738-17>
- Mondal, S., Dutta, S., Crespo-Herrera, L., JulioHuerta-Espino, J., Braun, H.J., Singh, R.P. (2020) Fifty years of semi-dwarf spring wheat breeding at CIMMYT: Grain yield progress in optimum, drought and heat stress environments *Field Crops Research*, 250, 107757. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2020.107757>
- Monteiro, M., Séneca, J., Magalhães, C., 2014. The history of aerobic ammonia oxidizers: From the first discoveries to today. *Journal of Microbiology* 52, 537-547. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4114-0>
- Moussa, T.A.A., Al-Zahrani, H.S., Almaghribi, O.A., Abdelmoneim, T.S., Fuller, M.P., 2017. Comparative metagenomics approaches to characterize the soil fungal communities of western coastal region, Saudi Arabia. *PLoS One* 12, e0185096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185096>
- Muñoz-Arenas, L.C., Fusaro, C., Hernández-Guzmán, M., Dendooven, L., Estrada-Torres, A., Navarro-Noya, Y.E., 2020. Soil microbial diversity drops with land use change in a high mountain temperate forest: a metagenomics survey. *Environ. Microbiol. Rep.* 1758-2229.12822. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12822>
- Murgia, M., Fiamma, M., Barac, A., Deligios, M., Mazzarello, V., Paglietti, B., Cappuccinelli, P., Al-Qahtani, A., Squartini, A., Rubino, S., Al-Ahdal, M.N., 2019. Biodiversity of fungi in hot desert sands. *Microbiologyopen* 8, e00595. <https://doi.org/10.1002/mbo3.595>
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schruppf, M., Daniel, R., 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS One* 6, e17000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017000>
- Narr, A., Nawaz, A., Wick, L.Y., Harms, H., Chatzinotas, A., 2017. Soil viral communities vary temporally and along a land use transect as revealed by virus-like particle counting and a modified community fingerprinting approach (fRAPD). *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01975>
- Nasko, D.J., Koren, S., Phillippy, A.M., Treangen, T.J., 2018. RefSeq database growth influences the accuracy of k-mer-based lowest common ancestor species identification. *Genome Biol.* 19, 165. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1554-6>
- Navarro-Noya, Y. E., Gómez-Acata, S., Montoya-Ciriaco, N., Rojas-Valdez, A., Suárez-Arriaga, M. C., Valenzuela-Encinas, C., ... Dendooven, L. (2013). Relative impacts of tillage, residue management and crop-rotation on soil bacterial communities in a semi-arid agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.009>
- Neal AL, Ahmad S, Gordon-Weeks R, Ton J. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS One*. 2012;7(4):e35498. doi: 10.1371/journal.pone.0035498
- 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, 424. <https://doi.org/10.3390/genes10060424>
- Niu, B., Paulson, J.N., Zheng, X., Kolter, R., 2017. Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2450-E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
- Niu, B., Paulson, J.N., Zheng, X., Kolter, R. (2017) Simplified and representative bacterial community of maize roots *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Mar 21; 114(12): E2450–E2459. doi: 10.1073/pnas.1616148114
- Nivelle, E., Verzeaux, J., Habbib, H., Kuzyakov, Y., Decocq, G., Roger, D., Lacoux, J., Duclercq, J., Spicher, F., Nava-Saucedo, J.-E., Catterou, M., Dubois, F., Tétu, T., 2016. Functional response of soil microbial communities to tillage, cover crops and nitrogen fertilization. *Applied Soil Ecology* 108, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.08.004>
- Norman JS, King GM, Friesen ML. *Rubrobacter spartanus* sp. nov., a moderately thermophilic oligotrophic bacterium isolated from volcanic soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Sep;67(9):3597-3602. doi: 10.1099/ijssem.0.002175
- Nunes-Alves, C., 2016. Microbial ecology: Do it yourself nitrification. *Nat Rev Micro* 14, 61-61.
- Okoh, T., Edu, E., 2019. Nutrient dynamics in decomposing litter from four selected tree species in Makurdi, Benue State, Nigeria. *J Ecology Environ*, 43(38) <https://doi.org/10.1186/s41610-019-0139-y>
- Oksanen, J. F. Guillaume Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs and H. Wagner, *Vegan package in R. Community Ecology Package, Version: 2.4-4.*
- Ollivier, J., Töwe, S., Bannert, A., Hai, B., Kastl, E.-M., Meyer, A., Su, M.X., Kleineidam, K., Schloter, M.,

2011. Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 3-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01165.x>
- Ouyang Y, Norton JM. Short-Term Nitrogen Fertilization Affects Microbial Community Composition and Nitrogen Mineralization Functions in an Agricultural Soil. *Appl Environ Microbiol.* (2020) Feb 18;86(5):e02278-19. doi: 10.1128/AEM.02278-19
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F., Stevens, R., 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42, D206-D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Panelli, S., Capelli, E., Comandatore, F., Landinez-Torres, A., Granata, M.U., Tosi, S., Picco, A.M., 2017. A metagenomic-based, cross-seasonal picture of fungal consortia associated with Italian soils subjected to different agricultural managements. *Fungal Ecol.* 30, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.07.005>
- Patiño-Zúñiga, L., Ceja-Navarro, J. A., Govaerts, B., Luna-Guido, M., Sayre, K. D., & Dendooven, L. (2009). The effect of different tillage and residue management practices on soil characteristics, inorganic N dynamics and emissions of N₂O, CO₂ and CH₄ in the central highlands of Mexico: a laboratory study. *Plant and Soil*, 314(1-2), 231-241. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9722-1>
- Pattnaik S, Dash D, Mohapatra S, Pattnaik M, Marandi AK, Das S, Samantaray DP. (2020). Improvement of rice plant productivity by native Cr(VI) reducing and plant growth promoting soil bacteria *Enterobacter cloacae*. *Chemosphere.* 240:124895. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124895
- Peřořoh, D., 2015. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. *Fungal Divers.* 75, 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0334-9>
- Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E., Loy, A., Wagner, M., Daims, H., 2014. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing N itrospira. *Environmental Microbiology* 16, 3055-3071. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300>
- Powell, S., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Kuhn, M., Muller, J., Arnold, R., Rattei, T., Letunic, I., Doerks, T., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2012. eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic Acids Res.* 40, D284-D289. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1060>
- Pritesh P, Avnika P, Kinjal P, Jinal HN, Sakthivel K, Amaresan N. Amelioration effect of salt-tolerant plant growth-promoting bacteria on growth and physiological properties of rice (*Oryza sativa*) under salt-stressed conditions. *Arch Microbiol.* 2020 Nov;202(9):2419-2428. doi: 10.1007/s00203-020-01962-4. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32591911.
- Quinn, T.P., Erb, I., Gloor, G., Notredame, C., Richardson, M.F., Crowley, T.M., 2019. A field guide for the compositional analysis of any-omics data. *Gigascience* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz107>
- R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available in <https://www.r-project.org/>
- Ramirez-Villanueva, D.A., Bello-López, J.M., Navarro-Noya, Y.E., Luna-Guido, M., Verhulst, N., Govaerts, B., Dendooven, L., 2015. Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices. *Applied Soil Ecology* 90, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.01.010>
- Ransom-Jones, E., McCarthy, A.J., Haldenby, S., Doonan, J., McDonald, J.E., 2017. Lignocellulose-degrading microbial communities in landfill sites represent a repository of unexplored biomass-degrading diversity. *mSphere* 2, e00300-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00300-17>
- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A., 2013. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS ONE* 8, e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- Redin, M., Recous, S., Aita, C., Dietrich, G., Skolaude, C.A., Ludke, W.H., Schmatz R., Giacomini, S.J., (2014). How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 78, 65-75 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.014>
- Rodrigues, J.L.M., Pellizari, V.H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E. d. C., Paula, F.S., Mirza, B., Hamaoui, G.S., Tsai, S.M., Feigl, B., Tiedje, J.M., Bohannan, B.J.M., Nusslein, K., 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 988-993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220608110>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J.* 4, 1340-1351.

- <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>
- Salinas-Garcia, J.R., Hons, F.M. and Matocha, J.E. (1997), Long-Term Effects of Tillage and Fertilization on Soil Organic Matter Dynamics. *Soil Science Society of America Journal*, 61: 152-159. <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010023x>
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schmidt, R., Gravuer, K., Bossange, A.V., Mitchell, J., Scow, K. (2018). Long-term use of cover crops and no-till shift soil microbial community life strategies in agricultural soil. *PLOS ONE* 13, e0192953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192953>
- Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Segobola, J., Adriaenssens, E., Tsekoa, T., Rashamuse, K., Cowan, D., 2018. Exploring viral diversity in a unique south African soil habitat. *Sci. Rep.* 8, 111. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18461-0>
- Sengupta, A., Hariharan, J., Grewal, P.S., Dick, W.A., 2020. Bacterial community dissimilarity in soils is driven by long-term land-use practices. *AgroSystems, Geosciences & Environment* 3, e20031. <https://doi.org/10.1002/agg2.20031>
- Shah V, Shah S, Kambhampati MS, Ambrose J, Smith N, Dowd SE, McDonnell KT, Panigrahi B, Green T. (2011) Bacterial and archaea community present in the Pine Barrens Forest of Long Island, NY: unusually high percentage of ammonia oxidizing bacteria. *PLoS One*. 2011;6(10):e26263. doi: 10.1371/journal.pone.0026263.
- Sinigalliano, C.D., Kuhn, D.N., Jones, R.D., 1995. Amplification of the amoA gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2702-6.
- Smith, C. R., Blair, P. L., Boyd, C., Cody, B., Hazel, A., Hedrick, A., Kathuria, H., Khurana, P., Kramer, B., Muterspaw, K., Peck, C., Sells, E., Skinner, J., Tegeler, C. and Wolfe, Z. (2016). Microbial community responses to soil tillage and crop rotation in a corn/soybean agroecosystem. *Ecology and Evolution*, 6: 8075-8084. doi: <https://doi.org/10.1002/ece3.2553>
- Soares MA, Li HY, Kowalski KP, Bergen M, Torres MS, White JF. Functional role of Bacteria from invasive *Phragmites australis* in promotion of host growth. *Microb Ecol*. 2016 Aug;72(2):407-17. doi: 10.1007/s00248-016-0793-x. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27260154.
- Sommermann, L., Geistlinger, J., Wibberg, D., Deubel, A., Zwanzig, J., Babin, D., Schlüter, A., Schellenberg, I., 2018. Fungal community profiles in agricultural soils of a long-term field trial under different tillage, fertilization and crop rotation conditions analyzed by high-throughput ITS-amplicon sequencing. *PLoS One* 13, e0195345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195345>
- Souza, R.C., Hungria, M., Cantão, M.E., Vasconcelos, A.T.R., Nogueira, M.A., Vicente, V.A., 2015. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Appl. Soil Ecol.* 86, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.010>
- Spain, A.M., Krumholz, L.R., Elshahed, M.S., 2009. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME J.* 3, 992-1000. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.43>
- Staley, C., Breuillin-Sessoms, F., Wang, P., Kaiser, T., Venterea, R.T., Sadowsky, M.J., (2018). Urea amendment decreases microbial diversity and selects for specific nitrifying strains in eight contrasting agricultural soils. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00634>
- Stieglmeier, M., Alves, R.J.E., Schleper, C., 2014a. The Phylum Thaumarchaeota, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: other major lineages of Bacteria and the Archaea*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 347-362. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_338
- Stieglmeier, M., Mooshammer, M., Kitzler, B., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A., Schleper, C., 2014b. Aerobic nitrous oxide production through N-nitrosating hybrid formation in ammonia-oxidizing archaea. *ISME J.* 8, 1135-1146. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.220>
- Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M.B., Burgess, R., Baldrian, P., 2012. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 735-746. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x>
- Suarez C, Ratering S, Geissler-Plaum R, Schnell S. *Rheinheimera hassiensis* sp. nov. and *Rheinheimera muenzenbergensis* sp. nov., two species from the rhizosphere of *Hordeum secalinum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Apr;64(Pt 4):1202-1209. doi: 10.1099/ij.s.0.061200-0
- Suleiman, A.K.A., Lourenço, K.S., Pitombo, L.M., Mendes, L.W., Roesch, L.F.W., Pijl, A., Carmo, J.B., Cantarella, H., Kuramae, E.E., 2018. Recycling organic residues in agriculture impacts soil-borne microbial

- community structure, function and N₂O emissions. *Sci. Total Environ.* 631-632, 1089-1099. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.116>
- Sun R, Li W, Dong W, Tian Y, Hu C, Liu B. Tillage changes vertical distribution of soil bacterial and fungal communities. *Front Microbiol.* (2018) Apr 9;9:699. doi: 10.3389/fmicb.2018.00699
- Sun, S., Li, S., Avera, B.N., Strahm, B.D., Badgley, B.D., 2017. Soil bacterial and fungal communities show distinct recovery patterns during forest ecosystem restoration. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00966-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00966-17>
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G., 2011. Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Front. Microbiol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Thomson, B.C., Ostle, N.J., McNamara, N.P., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., 2010. Effects of sieving, drying and rewetting upon soil bacterial community structure and respiration rates. *J. Microbiol. Methods.* 83, 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.021>
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Befort, B.L., 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20260-20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Trubl, G., Jang, H.B., Roux, S., Emerson, J.B., Solonenko, N., Vik, D.R., Solden, L., Ellenbogen, J., Runyon, A.T., Bolduc, B., Woodcroft, B.J., Saleska, S.R., Tyson, G.W., Wrighton, K.C., Sullivan, M.B., Rich, V.I., 2018. Soil viruses are underexplored players in ecosystem carbon processing. *mSystems* 3, e00076-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00076-18>
- Tu, Q., Lin, L., Cheng, L., Deng, Y., He, Z., 2019. NCycDB: a curated integrative database for fast and accurate metagenomic profiling of nitrogen cycling genes. *Bioinformatics* 35, 1040-1048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty741>
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R.J., Enríquez-Aragón, J.A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., Dendooven, L., Marsch, R., 2008. Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* 12, 247-254. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0121-y>
- Valverde, A., De Maayer, P., Oberholster, T., Henschel, J., Louw, M.K., Cowan D. (2016) Specific microbial communities associate with the rhizosphere of *Welwitschia mirabilis*, a living fossil. *PLoS One* 11(4): e0153353. doi: 10.1371/journal.pone.0153353
- Verhulst, N., Kienle, F., Sayre, K.D., Deckers, J., Raes, D., Limon-Ortega, A., Tijerina-Chavez, L., Govaerts, B., 2011. Soil quality as affected by tillage-residue management in a wheat-maize irrigated bed planting system. *Plant Soil* 340, 453-466. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0618-5>
- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 952. <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
- Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., Heijden, M.G.A. van der, 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS* 111, 5266-5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111>
- Walker, C.B., de la Torre, J.R., Klotz, M.G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D.J., Brochier-Armanet, C., Chain, P.S.G., Chan, P.P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hugler, M., Karr, E.A., Konneke, M., Shin, M., Lawton, T.J., Lowe, T., Martens-Habbena, W., Sayavedra-Soto, L.A., Lang, D., Sievert, S.M., Rosenzweig, A.C., Manning, G., Stahl, D.A., 2010. Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8818-8823. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913533107>
- Walters, W.A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J.G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., Glavina del Rio, T., Tringe, S.G., Buckler, E.S., Dangl, J.L., Ley, R.E., 2018. Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 7368-7373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800918115>
- Wang, Z., Liu, L., Chen, Q. et al. (2016). Conservation tillage increases soil bacterial diversity in the dryland of northern China. *Agron. Sustain. Dev.* 36, 28. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0366-x>
- Wei, X., Zhu, Z., Liu, Y. et al. 2020. C:N:P stoichiometry regulates soil organic carbon mineralization and concomitant shifts in microbial community composition in paddy soil. *Biol. Fertil. Soils.* 56:1093-1107. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01468-7>
- Wieczorek, A.S., Schmidt, O., Chatzinotas, A., von Bergen, M., Gorissen, A., Kolb, S., 2019. Ecological functions of agricultural soil bacteria and microeukaryotes in chitin degradation: a case study. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01293>
- Wilhelm, R.C., Singh, R., Eltis, L.D., Mohn, W.W., 2019. Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *ISME J.* 13, 413-429. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0279-6>
- Williamson, K.E., Fuhrmann, J.J., Wommack, K.E., Radosevich, M., 2017. Viruses in soil ecosystems: an

- unknown quantity within an unexplored territory. *Annu. Rev. Virol.* 4, 201-219. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041639>
- Wood, D.E., Lu, J., Langmead, B., 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wu, H., Moore, E., 2010. Association analysis of the general environmental conditions and prokaryotes' gene distributions in various functional groups. *Genomics* 96, 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.007>
- Wu, L., Wang, J., Wu, H., Chen, J., Xiao, Z., Qin, X., Zhang, Z., Lin, W., 2018. Comparative metagenomic analysis of rhizosphere microbial community composition and functional potentials under *Rehmannia glutinosa* consecutive monoculture. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2394. <https://doi.org/10.3390/ijms19082394>
- Xiong, W., Li, R., Guo, S., Karlsson, I., Jiao, Z., Xun, W., Kowalchuk, G.A., Shen, Q., Geisen, S., 2019. Microbial amendments alter protist communities within the soil microbiome. *Soil Biol. Biochem.* 135, 379-382. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.025>
- Xu L, Naylor D, Dong Z, Simmons T, Pierroz G, Hixson KK, Kim Y-M, Zink EM, Engbrecht KM, Wang Y, Gao C, DeGraaf S, Madera MA, Sievert JA, Hollingsworth J, Birdseye D, Scheller H V, Huttmacher R, Dahlberg J, Jansson C, Taylor JW, Lemaux PG, Coleman-Derr D. 2018. Drought delays development of the sorghum root microbiome and enriches for monoderm bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 115:E4284 LP-E4293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717308115>
- Y. Li, R. Xi, W. Wang, H. Yao, The relative contribution of nitrifiers to autotrophic nitrification across a pH-gradient in a vegetable cropped soil. *J Soils Sediments* 19, 1416–1426 (2019).
- Yang, Y., Wang, N., Guo, X., Zhang, Y., Ye, B. (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing *PLoS One.* 2017; 12(5): e0178425. doi: 10.1371/journal.pone.0178425
- Yao, F., Yang, S., Wang, Z., Wang, Xue, Ye, J., Wang, Xugao, DeBruyn, J.M., Feng, X., Jiang, Y., Li, H., 2017. Microbial taxa distribution is associated with ecological trophic cascades along an elevation gradient. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02071>
- Yin, Y., Fischer, D., 2008. Identification and investigation of ORFans in the viral world. *BMC Genomics* 9, 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-24>
- Zboralski, A., Filion, M., (2020) Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phyto-beneficial *Pseudomonas* spp *Comput Struct Biotechnol J.* 18:3539-3554. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.025
- Zhalnina, R., Katerynaand Dias, de Quadros, P.D., Davis-Richardson, A., Camargo, F.A.O., Clark, I.M., McGrath, S.P., Hirsch, P.R., Triplett, E.W., 2015. Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology* 69, 395-406. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0530-2>
- Zhang, X., Davidson, E.A., Mauzerall, D.L., Searchinger, T.D., Dumas, P., Shen, Y., 2015. Managing nitrogen for sustainable development. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature15743>
- Zhao, J., Ni, T., Li, Y., Xiong, W., Ran, W., Shen, B., Shen, Q., Zhang, R., 2014. Responses of bacterial communities in arable soils in a rice-wheat cropping system to different fertilizer regimes and sampling times. *PLoS One* 9, e85301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085301>
- Zhao, Z.-B., He, J.-Z., Geisen, S., Han, L.-L., Wang, J.-T., Shen, J.-P., Wei, W.-X., Fang, Y.-T., Li, P.-P., Zhang, L.-M., 2019. Protist communities are more sensitive to nitrogen fertilization than other microorganisms in diverse agricultural soils. *Microbiome* 7, 33. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0647-0>
- Zheng L, Zhao X, Zhu G, Yang W, Xia C, Xu T. (2017) Occurrence and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria from the surface to below the water table, in deep soil, and their contributions to nitrification. *Microbiologyopen.* 6(4):e00488. doi: 10.1002/mbo3.488
- Zhou, J., Jiang, X., Wei, D., Zhao, B., Ma, M., Chen, S., Cao, F., Shen, D., Guan, D., Li, J., (2017). Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in black soils for two crop seasons in China. *Scientific Reports* 7, 3267. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03539-6>.